

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-261933

(43)Date of publication of application : 20.09.1994

(51)Int.Cl.

A61L 27/00

// A01N 1/02

(21)Application number : 05-047373

(71)Applicant : LIFECELL CORP

(22)Date of filing : 12.02.1993

(72)Inventor : LIVESEY STEPHEN A  
DEL CAMPO ANTHONY A  
NAG ABHIJIT  
NICHOLS KEN B  
GRIFFEY EDWARD S  
COLEMAN CHRISTOPHER

(30)Priority

Priority number : 92 835138  
93 4752

Priority date : 12.02.1992  
02.02.1993

Priority country : US  
US

## (54) METHOD FOR PROCESSING AND PRESERVING COLLAGEN BASE TISSUE FOR IMPLANTATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for processing and preserving a non-cellular collagen base tissue substrate for implanting.

CONSTITUTION: This method comprises a processing treatment of an organic tissue with a stabilizing solution for decreasing an acquired disorder, a treatment with a processing solution for removing cells, a treatment with a frozen protection solution as well as steps of freezing, drying, storing, rehydrating and reconstructing with organic cells.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 04.06.2002

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2002-16843

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 02.09.2002

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00		V 7167-4C		
// A 0 1 N 1/02		9159-4H		

審査請求 未請求 請求項の数35 F D (全 20 頁)

(21)出願番号	特願平5-47373	(71)出願人	591202029 ライフセル コーポレイション アメリカ合衆国 テキサス州 77381 ザ ウッドランズ リサーチ フォレスト ドライブ 3606エイ
(22)出願日	平成5年(1993)2月12日	(72)発明者	スティープン、エイ、リブシー オーストラリア国ビクトリア、エルサム、 ナボレオン、ストリート、104
(31)優先権主張番号	8 3 5 1 3 8	(72)発明者	アンソニー、エイ、デル、カンボ アメリカ合衆国テキサス州、ヒュースト ン、オーククロフト、11810
(32)優先日	1992年2月12日	(74)代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	4 7 5 2		
(32)優先日	1993年2月2日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 移植用にコラーゲンベース組織を加工処理、保存するための方法

## (57)【要約】

【目的】 移植用に無細胞コラーゲンベース組織基質を加工処理及び保存するための方法を提供する。

【構成】 その方法は獲得障害を減少させるため安定化溶液での生物組織の加工処理、細胞を除去するため加工処理溶液での処理、凍結保護溶液での処理、しかる後機能的に重大な障害を排除する条件下における凍結、乾燥、貯蔵及び再水和と生細胞での再構成の工程を含んでなる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コラーゲンベース組織を移植用に加工処理するための方法であって、

- (a) 上記組織を獲得する；及び  
(b) 細胞成分を除去するために上記組織を加工処理する；ことを含んでなる方法。

【請求項 2】 加工処理後に組織を架橋剤で固定する工程を更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 加工処理後に組織を低温調製、凍結及び乾燥する工程を更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 組織を含水率 20～70%まで再水和する工程を更に含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 再水和された組織を生細胞で再構成する工程を更に含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 乾燥後に組織を架橋剤で固定する工程を更に含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】 コラーゲンベース組織が、一種以上の哺乳動物に由来する、皮膚、血管、心臓弁、韧带、腱、骨、軟骨、硬膜、神経及び他の類似組織からなる群より選択されるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 獲得後に組織を安定化溶液中でインキュベートする工程を更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 安定化溶液が下記成分のうち一種以上を含有してなるものである、請求項 8 に記載の方法。

(a) 低酸素症障害を防止するための酸化防止剤であって、二級ブチルヒドロキノン、 $\alpha$ -トコフェロール、マンニトール、ヒドロキシ原素、グルタチオン、アスコルビン酸、エチレンジアミン四酢酸、アミノ酸のヒスチジン、プロリン及びシステイン並びにそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(b) 低酸素症関連ラジカル形成に起因する障害を最少に抑えるための酵素剤であって、スーパーオキシジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼ、グルタチオンレダクターゼ及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(c) 低酸素症関連生化学経路変換を阻害するための化学剤であって、アプロブノール、リボキシゲナーゼ阻害剤、リン脂質メチル化阻害剤、カルシウムチャンネル遮断薬、カルシウム結合剤、鉄結合剤、代謝中間体、アデノシン三リン酸生成の基質及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(d) 抗生物質であって、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ポリミキシン、バントラシン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(e) 抗真菌剤であって、ニスタチン、バンコマイシン、アンホテリシン B 及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(f) プロテアーゼ阻害剤であって、N-エチルマレイ

ミド、フェニルメチルスルホニルフルオリド、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸 (2-アミノエチルエーテル)・N, N, N', N'-四酢酸、ロイペプチン、塩化アンモニウム、アポロチニン、水素イオン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(g) プロテオグリカン腫瘍剤であって、コンドロイチン硫酸、ヘパリン硫酸、デルマトン硫酸及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(h) 緩衝剤であって、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン・N'-2-エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、炭酸水素塩、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、酢酸塩・クエン酸塩及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(i) 血小板付着、凝集及び活性化を阻害するための化学剤であって、ヘパリン、ニトロプルシドナトリウム、H7、イソブチルメチルキサンチン、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、サリチル酸、ジビリダモール、ダソキシベン、アデノシン、プロスタサイクリン、アミロリド、アマンタジン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(j) 平滑筋収縮を防止するための化学剤であって、ニトロプルシドナトリウム、イソプロレノール、フェントラミン、ビナジール、H7、ニフェジン、カルシウム伝達子関連ペプチド、フルラジン、ババベリン、イソブチルメチルキサンチン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(k) 腫瘍剤であって、デキストラン、グリシン、プロリン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

【請求項 10】 組織を加工処理溶液中でインキュベートする工程を更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】 加工処理溶液が下記成分のうち一種以上を含有してなるものである、請求項 10 に記載の方法。

(a) 塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、リン酸カリウム及びそれらの組合せからなる群より選択される塩。

(b) 界面活性剤であって、ポリエチレン (100) グリコールテトラオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン (80) ソルビタンモノオレート、デオキコール酸ナトリウム、3-[(3-クロミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸、オクチルグルコシド、D-デシル硫酸ナトリウム及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(c) ジスパーゼ II、トリプシン、ヒアルロニダーゼ、サーモリシン及びそれらの組合せからなる群より選択される酵素。

(d) プロテアーゼ阻害剤であって、N-エチルマレイ

3

ミド、フェニルメチルスルホニルフルオリド、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジグリコールビス(2-アミノエチルエーテル)-N、N、N'、N'-四酢酸、ロイペプチン、塩化アンモニウム、高pH、アポプロチニン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(e) 緩衝剤であって、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、炭酸水素塩、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、酢酸塩・クエン酸塩及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

【請求項12】 架橋剤がグルタルアルデヒドである、請求項2に記載の方法。

【請求項13】 低温調製工程が、低温保存溶液中における組織のインキュベートと、その後の組織の凍結とからなる、請求項3に記載の方法。

【請求項14】 低温保存溶液が一種以上の凍結保護剤を含んでなる、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 低温保存溶液が一種以上の乾燥保護剤を更に含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項16】 凍結保護溶液が、凍結中に膨張又は収縮しない、有機溶媒と水の組合せを含んでなるものである、請求項13に記載の方法。

【請求項17】 凍結保護剤が、ジメチルスルホキシド、2,3-ブタンジオール、ポリビニルピロリドン、プロピレングリコール、1,2-プロパンジオール、グリセロール、フルクトース、トレハロース、ラフィノース、ヒドロキシエチルデンプン、デキストラン、スクロース、ソルビトール、ブドウ糖、ヒト血清アルブミン及びそれらの組合せからなる群より選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項18】 乾燥保護剤が、スクロース、ラフィノース、トレハロース、亜鉛、ブドウ糖、ミリスチン酸、スベルミン及びそれらの組合せからなる群より選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項19】 凍結工程が、-20℃以下の最終組織温度まで-1℃/min〜5000℃/secの速度で組織を冷却することにより行われる、請求項3に記載の方法。

【請求項20】 乾燥が、凍結サンプルの最少熱安定性氷結晶のガラス転移以下で起こりかつ連続してその後により安定な各氷結晶が同様に乾燥されるような温度、真空、コンデンサー表面方向、コンデンサー表面温度及び加熱の条件下で乾燥が行われる、請求項3に記載の方法。

【請求項21】 乾燥が-70℃以上の温度における凍結乾燥からなる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 乾燥が-130〜-80℃以上の中間温度範囲における連続相乾燥からなる、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 乾燥が-160〜-90℃以上の分子蒸

4

留乾燥による連続相乾燥からなる、請求項20に記載の方法。

【請求項24】 再水和が液体再水和溶液中で組織をインキュベートすることにより行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項25】 再水和溶液が正常塩水、リンゲル乳酸液、細胞培地及びそれらの組合せからなる群より選択される緩衝液を含むものである、請求項24に記載の方法。

10 【請求項26】 再水和溶液が下記からなる群より選択される剤を含むものである、請求項24に記載の方法。

(a) 低酸素症障害を防止するための酸化防止剤であって、三級ブチルヒドロキノン、 $\alpha$ -トコフェロール、マンニトール、ヒドロキシ尿素、グルタチオン、アスコルビン酸、エチレンジアミン四酢酸、アミノ酸のヒスチジン、プロリン及びシステインとそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

20 (b) 低酸素症関連ラジカル形成に起因する障害を最少に抑えるための酵素剤であって、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼ、グルタチオンレダクターゼ及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(c) 低酸素症関連生化学経路変換を阻害するための化学剤であって、アロプリノール、リボキシゲナーゼ阻害剤、リン脂質メチル化阻害剤、カルシウムチャンネル遮断薬、カルシウム結合剤、鉄結合剤、代謝中間体、アデノシン三リン酸生成の基質及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

30 (d) 抗生物質であって、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ポリミキシン、バシラジン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(e) 抗菌剤であって、ニスタチン、バンコマイシン、アンホテリシンB及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

40 (f) プロテアーゼ阻害剤であって、N-エチルメレイミド、フェニルメチルスルホニルフルオリド、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジグリコールビス(2-アミノエチルエーテル)-N、N、N'、N'-四酢酸、ロイペプチン、塩化アンモニウム、アポプロチニン、水素イオン及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(g) プロテオグリカン腫瘍剤であって、コンドロイチン硫酸、ヘパリン硫酸、デルマトン硫酸及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(h) 緩衝剤であって、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、炭酸水素塩、リン酸カリウム、リン

5

酸ナトリウム、酢酸塩・クエン酸塩及びそれらの組合せからなる群より選択されるもの。

(i) 血小板付着、凝集及び活性化を阻害するための剤であって、ヘパリン、ニトログリシドナトリウム、H 7、インブチルメチルキサンチン、ε-アミノカプロン酸、アスピリン、ジビラダモール、ダソキシベン及びアデニンからなる群より選択されるもの。

(j) 腫瘍剤であって、デキストラン、グリシン及びブドウ糖からなる群より選択されるもの。

【請求項27】乾燥、低温調製、加工処理された組織の再水和が、再水和された組織を形成するため気化再水和溶液の添加と、その後の液体再水和溶液中でのインキュベートの工程とを更に含んでなる、請求項24に記載の方法。

【請求項28】再水和された組織を自家細胞、同種細胞又はそれらの組合せからなる群より選択される生細胞で更に接種することからなる、請求項24に記載の方法。

【請求項29】再水和溶液が架橋剤である、請求項24に記載の方法。

【請求項30】架橋剤がグルタルアルデヒドである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】移植用にコラーゲンベース組織を加工処理するための方法であって、

(a) 上記組織を獲得し、浸透圧、低酸素、自己分解及びタンパク質分解を防止してかつ微生物汚染から保護するため上記組織を安定化溶液中に入れ、

(b) 上記組織を加工処理溶液中でインキュベートし(ここで、前記した加工処理溶液は上記組織の構造タンパク質及びコラーゲン基質から生細胞を抽出する上で機能的に有効である)、

(c) 凍結保護溶液中でのインキュベートにより上記加工処理組織を低温調製し、構造タンパク質及びコラーゲン基質のタンパク質における機能障害が最小となるような冷却速度で上記低温調製された加工処理組織を凍結し、

(d) 実質的水再結晶化又は超微細構造障害なしに水を除去する温度及び圧力条件下で上記低温調製された加工処理組織を乾燥し、その乾燥で上記組織の残留水分を、上記組織の貯蔵及び再水和を双方とも可能にするようなものとし、

(e) 再水和溶液中で上記乾燥組織をインキュベートし、(ここで、前記した再水和溶液は浸透圧、低酸素、自己分解又はタンパク質分解障害、微生物汚染及び超微細構造障害を防止しかつ20〜70%の上記組織最終水分とする上で有効である)、そして

(f) 上記再水和された組織を自家細胞、同種細胞又はそれらの組合せからなる群より選択される生細胞で接種することからなる方法。

【請求項32】凍結保護剤が、ガラス質化溶液を含むし、そのガラス質化溶液がジメチルスルホキシド、プロ

6

ピレングリコール、2, 3-ブタンジオール、ラフィノース、スクロース、ポリビニルピロリドン、デキストラン、トレハロース及びホルミアミドからなる群より選択される一種以上の成分を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】再水和された組織が真皮を含んでなる、請求項31に記載の方法。

【請求項34】再水和された組織が静脈又は動脈源の1以上の血管を含んでなる、請求項31に記載の方法。

【請求項35】再水和された組織が1以上的心臓弁を含んでなる、請求項31に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】【発明の背景】

(産業上の利用分野) 本発明は、ヒト又は他の動物への移植用にヒト及び動物由来するコラーゲンベース組織を獲得し、脱細胞し、更に加工処理及び乾燥保存するための方法に関する。これらの方法により、受容体により外来として認識される主要組織適合性複合抗原決定基及び他の抗原を正常に発現するある生細胞を欠いた選択的保存細胞外タンパク質基質からなる組織品が調製される。この細胞外タンパク質基質はコラーゲン及び他のタンパク質から構成され、宿主により拒絶されない新しい生細胞で再集団化させてもよい構造の鋳型を提供する。これらの生細胞は移植前後の宿主(自家細胞)でも、又は、包皮、臍帯もしくは流産胎児組織を含めた他のヒト由来してもよい。更に詳しくは、本発明は移植後の合併症(格別限定されず、免疫拒絶、拘縮、石灰化、閉塞及び感染を含む)が、その移植操作及び物質に対して有意に減少されるようなコラーゲンベース組織の獲得及び加工処理に関する。

【0002】(従来の技術) 組織及び臓器移植は手術操作の改善、免疫抑制薬の進歩及び移植片/宿主相互作用の知識増加の結果として急速に成長している治療分野である。この分野における大きな進歩にもかかわらず、現代の組織移植は炎症、分解、瘢痕、拘縮、石灰化(硬化)、閉塞及び拒絶を含めた合併症を伴ったままである。改善された移植可能な組織移植片の工学処理に関する多数の研究が進行中であるが、しかしながら理想的な移植片がなおも産生されねばならないと一般的に考えられている。

【0003】自家又は自己由来ヒト組織が移植操作でよく用いられる。これらの操作としては冠状及び末梢血管バイパス手術があり、その場合に血管、通常静脈が体の一部他領域から採取され、1以上の危機的動脈で閉塞血流を治療するために移植される。自家組織のもう1つの応用は、3度熱傷及び他の全厚皮膚損傷の治療である。この治療では無傷部位から創傷部位に健全な皮膚を移植するが、そのプロセスは中間層皮膚移植と呼ばれる。自家組織移植の他の応用としては再構築操作に用いられる骨、軟骨及び筋移植がある。

【0004】移植に自家組織を用いる動機は、免疫拒絶の合併症が除かれて生存移植片に関する状態を高めるといふ概念に基づいている。しかし残念ながら、他の合併症が自家移植片に付随することがある。例えば、かなりの障害が採取時及び内植前に移植血管のいくつかの組織成分に起きる。この障害としては血管壁における平滑筋細胞の機械的収縮があり、内皮の喪失、平滑筋細胞の低酸素症及び死を引き起こす。低酸素障害は細胞リソソームから細胞外基質にかなりの障害を与える酵素を放出させる。内植後、このような障害は血小板付着、白血球及びマクロファージ侵入を増加させ、しかる後更に血管壁に障害を与える。このような障害の最終結果は内植後初期における血栓症及び閉塞である。このような障害がなくとも、移植された自家血管は典型的には血管壁の肥厚化とアテローム性動脈硬化の進行を起し、後で閉塞を生じる。この現象の正確な原因は不明であるが、但し高い血圧及び流速の動脈部位における血管のコンプライアンスミスマッチに関連しているのであろうと思われる。この現象は獲得時に生じるあらゆる初期平滑筋細胞及び基質障害により増加及び加速される。移植血管の閉塞は撻逐しバイパス操作を要し、その結果追加自家血管の再採取又は合成管もしくは非自家血管での置換えを要することになる。

【0005】自家組織移植に起因する合併症のもう1つの例は、全厚創傷修復用の中間層皮膚移植片で生じうる瘢痕及び拘縮である。中間層皮膚移植片は、典型的には皮膚に小スリットのパターンを導入するメッシュ化装置の使用により機械的に広げられる。次いで中間層皮膚移植片はより大きな創傷面積を覆うように引き伸ばされる。分裂する表皮細胞は最終的にスリットの領域中に増殖してそれを覆うが、しかしながら下層真皮支持基質はこれらの領域中に容易に広がる。コラーゲン、他の細胞外タンパク質基質タンパク質及び基底膜複合体から主に構成される真皮基質は皮膚の伸長性、可塑性に関与している。真皮基質の不存在はスリットの領域で瘢痕及び拘縮を生じる。この拘縮は重度であり、広範囲の中間層皮膚移植をうける大規模熱傷患者のケースにおいては関節の動きを回復するためで後放手術操作を要する。

【0006】移植可能な自家組織の供給が枯渇した場合又は移植片（例えば、心臓弁代替物）用に利用しうる適切な自家組織がない場合には、人工合成物質、動物由来組織及び組織品又は他の個体から供与される（通常死体由来する）同種ヒト組織を含めた代替物も使用してよい。人工内植物質としては時々管状に成形されかつ一部末梢動脈バイパス操作用に血液管として用いられる合成ポリマー（例えば、(PTFE) ポリテトラフルオロエチレン、ダクロン(Dacron)及びゴレテックス(Goretex)）がある。更に、人工合成品（ポリウレタン）及び親水コロイド又はゲルも中間層皮膚移植前に一時的創傷ドレッシングとして用いてよい。

【0007】他の人工物質としては補綴心臓弁に成形され、大心臓弁取替え操作作用に利用されるプラスチック及びカーボン化金属がある。合成物質は低免疫原性で得られるが、但し他の制限を生じる。機械的心臓弁のケースにおいて、それらの飛行動態特徴からは一生の抗血栓治療法を要する。上記ひざ末梢血管バイパス操作でよく用いられる合成血管は、自家移植片よりも更に高い閉塞頻度を生じる。多くのケースにおいては、加工処理された動物組織又は新鮮なもしくは低温保存された同種ヒト組織である生物内植片が好まれる。

【0008】化学処理された動物組織（ウシ又はブタ）は欠陥ヒト心臓弁用の代替物として通常用いられ、血管用に過去用いられてきた。化学的処理に関する概念は、グルタルアルデヒド又は類似架橋剤での架橋により構造タンパク質及びコラーゲン基質を安定化させることである。この処理はヒト宿主が内植片を外来として認識しないで免疫拒絶反応を排除するように抗原決定基をマスクする。しかしながら、グルタルアルデヒド処理組織は改造にとり必要な宿主細胞を移入させず、宿主による石灰化の結果として徐々に硬化する。従って、グルタルアルデヒド処理組織は5〜7年間で取替え通常要する。グルタルアルデヒド処理ウシ血管が血管バイパス操作で過去用いられてきたが、しかしながらそれらの使用は動脈瘤形成及び閉塞の許容されない発生率によって中止された。

【0009】同種移植組織の使用は心臓弁置換え操作、動脈バイパス操作、骨、軟骨及び韧带置換え操作と一時的ドレッシングとして全厚創傷治療に適用されてきた。同種組織は新鮮なままで用いても又は細胞成分の生存力を維持するためDMSO及び/又はグリセロールの使用で低温保存してもよい。細胞成分は組織適合性抗原を含み、宿主から免疫応答を誘導できると考えられている。多くのケースにおいて、同種移植片をもつ患者は免疫抑制療法をうける。この療法にもかかわらず、心臓弁及び血管を含めた多くの同種移植片は炎症反応をうけ、5〜10年以内に脱落する。同種移植片は典型的には適用から1〜5週間以内で置換えられるが、免疫抑制薬の使用があっても宿主により永久に許容されることは決して証明されなかった。

【0010】代替となる加工処理法は、同種及び動物由来移植組織の制限に取組むことを考えた者により開発されてきた。凍結乾燥は、移植のため同種骨の加工処理で日常的に用いられている。凍結乾燥プロセスでは、新鮮な又は低温保存された同種骨と比較して有意の拒絶反応を示さない移植片を生じることがわかった。凍結乾燥された骨は内植後に鋳型として作用し、しかる後これは宿主により改造される。凍結乾燥プロセスが心臓弁のような更に複雑な組織に適用された場合、結果は雑多であるが、但し全体的には不満足であった。15例の同種心臓弁が移植前に凍結乾燥により加工処理される研究が実施

された。凍結乾燥された弁のほとんどは移植後初期の期間に機械的原因のせいであらう失敗した。しかしながら、失敗しなかった凍結乾燥弁は長期機能性を示した(15年以内)。

【0011】酵素及び界面活性剤加工処理もコラーゲンベースの移植可能な組織から抗原細胞を除去するために用いられた。有機溶媒及び界面活性剤処理は再構築手術後で用いられた硬膜のような比較的単純な組織でうまく用いられた。しかしながら、心臓弁、血管及び皮膚のような更に複雑な構造の化学的処理は臨床適用で限定的に成功しただけであった。

【0012】本発明は、移植のため複雑なコラーゲンベース組織の調製において、可能性のある障害事項について取扱う総合的処理技術である。その技術では、組織移植片が宿主により長期維持のため改造できるような鋳造機能の理想的特徴を発生させること、生化学的及び物理的双方の加工処理ステップを組合せている。

【0013】【発明の概要】その好ましい態様において、本発明による方法は、獲得障害を減少させるため安定化溶液での処理、細胞及び他の抗原組織成分を除去するため加工処理溶液での処理、凍結保護溶液での処理を含めた生物組織の加工処理、機械的にかなり障害のある氷晶形成を避ける特定条件下での凍結及び貯蔵、障害のある氷再結晶化を妨げる条件下での乾燥、上記凍結温度における乾燥状態での貯蔵、表面張力障害を最少化して更に基質の選択的保存性を増す再水和溶液での特定条件下における再水和、宿主により拒絶されない生細胞での再構成からなる工程を含んでいる。

【0014】【発明の具体的説明】本発明は、化学的前処理及び細胞除去、低温調製、乾燥安定化、乾燥、再水和と細胞再構成の工程により、移植用にコラーゲンベース生物組織を加工処理及び保存するための方法を提供する。その加工処理及び保存方法は特に下記基準と合致する移植可能な生物組織移植片を得るために考えられている：

(a) 宿主により改造及び修復される細胞外タンパク質及びコラーゲン基質を提供する。

(b) 生存内皮又は表皮細胞の確かな再付着のため無傷の基底膜を提供する。

(c) 宿主による免疫応答を示さない。

(d) 石灰化しない。

(e) 環境温度で容易に貯蔵及び輸送できる。

【0015】好ましい態様において、加工処理される生物組織は、まずヒト死体又は動物ドナーから獲得又は採取され、直ちに浸透圧、低酸素、自己分解及びタンパク質分解を阻止及び防止し、細菌汚染から保護し、平滑筋成分を含む組織(例えば、血管)で生じる機械的障害を減少させる安定化輸送溶液中に入れられる。安定化溶液は、適切な緩衝剤、一種以上の酸化防止剤、一種以上の腫脹剤、抗生物質、一種以上のプロテアーゼ阻害剤と、

そして一部のケースでは平滑筋細胞を通常含有する。

【0016】好ましい態様において、次いで組織は、基底膜複合体又はコラーゲン基質の構造の完全性に障害を与えることなく、構造基質から生抗原細胞(表皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞及び繊維芽細胞を含む)を除去するため、加工処理溶液中でインキュベートされる。加工処理溶液は、適切な緩衝剤、塩、抗生物質、一種以上の界面活性剤、一種以上のプロテアーゼ阻害剤及び/又は一種以上の酵素を通常含有する。この加工処理溶液による組織の処理は、基底膜複合体の分解が回避されてコラーゲン繊維及びエラスチンを含めた基質の構造の完全性が維持されるような時間にわたり一定濃度でなければならない。

【0017】組織が脱細胞化された後、それは低温保存溶液中でインキュベートされることが好ましい。好ましい態様において、この溶液は凍結中に生じる構造基質への氷晶障害を最少に抑える一種以上の凍結保護剤、乾燥中における構造の障害変更を最少に抑える一種以上の乾燥保護成分と、凍結中に膨張も又は収縮もしない有機溶媒及び水の組合せを通常含有する。これに代わる方法として、脱細胞化された組織基質は、グルタルアルデヒドのような架橋剤で固定されて、移植に先立ち貯蔵される。この低温保存溶液中でのインキュベート後、組織は水蒸気に対して透過性であるが細菌に対しては不透透性であるポーチ又はバイアルのような無菌容器内にパッケージ化される。

【0018】好ましい態様において、このポーチの片側はデュポン社(デュポン社(DuPont Company))の商標製品、医療用多孔質polymeric膜からなる。この膜は水蒸気に対して多孔性でかつ細菌及びほこりに対して不透透性である。polymeric膜は片側を開けたままにして2.5mm不透透性ポリエチレンミネネットシートにヒートシールされ、こうして二側ポーチを形成する。開いたポーチは使用前に7線で縫合される。組織はこの開口部から無菌ポーチ内に無菌的にいれられる。次いで開口部はポーチを閉じるため無菌的にヒートシールされる。パッケージ化された組織は、その後加工処理工程全体にわたり微生物汚染から保護される。

【0019】好ましい態様において、パッケージ化された組織は障害をうける六方晶氷を最少にして低安定性氷形の非晶質及び立方晶相を形成するため、特定の凍結保護剤と適合する特定速度で低温に冷却される。次いで組織は、水蒸気が氷再結晶化せずに各氷晶相から連続除去されるような真空条件下において低温で乾燥される。このような乾燥は、慣用的な凍結乾燥によるか又は既に特許化された分子蒸留乾燥機を用いられずに行われる。適切な分子蒸留乾燥機はテキサス州、ウッドランズのライフセル社(LifeCell Corporation)から入手でき、米国特許第4,567,847号及び第4,799,361号明細書で開示されている(ここで、これら



の明細書は本明細書の開示の一部とされる)。

【0020】ボーチ中で乾燥されるサンプルの乾燥サイクルの完了後、凍結乾燥装置の真空は窒素、ヘリウム又はアルゴンのような乾燥不活性ガスで置換される。同様のガラス環境中で維持されながら、半透過性ボーチは不浸透性ボーチ内にいれられ、更にヒート又は加圧シールされる。したがって、乾燥サンプルの最終品は不活性ガス雰囲気下であり、不透過性ボーチ中に気密シールされる。

【0021】ガラスバイアル中で乾燥されるサンプルの乾燥サイクルの完了後、そのバイアルは真空下において適切な不活性スッパで密封され、凍結乾燥の真空は取出し前に不活性ガスで置換される。

【0022】好ましい態様において、パッケージ化された乾燥組織は環境条件下で長期間にわたり貯蔵してもよい。輸送は標準キャリアにより正常温度暴露及び配送時間に関して標準条件下で行ってよい。

【0023】好ましい態様において、乾燥された組織は移植前に再水和される。再水和時に浸透力及び表面張力効果を最少にすることが重要である。再水和の目的は、いかなる残留抗原細胞及び他の潜在的抗原成分も除去しながら、細胞外支持基質の選択的保存性を増すことである。適切な再水和は約10%相対湿度の環境下における乾燥組織の初期インキュベートと、その後の適切な再水和溶液への浸漬により行われる。一方、乾燥組織は高湿度環境下で事前のインキュベートなしに再水和溶液に直接浸漬してもよい。再水和はサンプルに浸透圧障害を起こすべきでない。蒸気再水和は理想的には少なくとも15%の残留水分レベルに達するべきであり、液体再水和は20〜70%の組織水分レベルに達するために含有されてよい。

【0024】再水和される組織に応じて、再水和溶液は単純な正常塩水、リングル乳酸液でも又は標準細胞培養地でもよい。組織が既に除去された細胞からの内在コラーゲン、エラスターゼ又は残留自己分解活性の作用に付される場合には、再水和溶液に対する添加剤が用意され、それにはプロテアーゼ阻害剤がある。残留ラジカル活性が存在する場合には、酸化防止剤、ラジカル障害から保護する酵素剤及び低酸素障害に起因する生化学経路の妨害を最少に抑える剤を含めた低酸素症から保護するための剤が用いられる。抗生物質も細菌汚染を防止するために含有されてよい。プロテオグリカン、デキストラン及び/又はアミノ酸の形である腫瘍剤も再水和時に基質に対する浸透圧障害を防止するために含有されてよい。乾燥サンプルの再水和は、それが再水和溶液の成分を速やかかつ均一に分配することから、特にこのプロセスに適する。加えて、再水和溶液は以前に使用されていない特定の成分、例えばアルカリホスファターゼを阻害してその後石灰化を防止するジホスホン酸塩を含有してもよい。再水和された細胞外基質の移植後に血管新生及び宿主細胞侵入を促進する剤も再水和溶液に含有させ

てよい。一方、再水和はグルタルアルデヒドのような架橋剤を含有した溶液で行ってもよい。

【0025】免疫寛容性細胞は、宿主により改造される永久許容移植片を産生するため再水和された構造基質に還元されねばならない。好ましい態様において、免疫寛容性細胞は、移植前にインビトロ培養技術により又は移植後にインビトロ再集団化により再構成される。

【0026】好ましい態様において、インビトロ再構成に用いられる細胞タイプは移植可能な移植片の性質に依存する。加工処理及び再水和された真皮からの全厚皮膚の再構成に関する主要な要求は、表皮細胞又はケラチン細胞の還元である。これらの細胞は、小メッシュ化中間層皮膚移植片の形で又は細胞培養条件下でシートに広げられた単層ケラチン細胞として、意図された受容患者から得てもよい。一方、包皮又は胎児起源に由来する同種ケラチン細胞も、表皮を培養及び再構成するために用いてよい。

【0027】心臓弁及び及び血管の再構成に関して重要な細胞は、組織の内表面をライニングする内皮細胞である。内皮細胞は培養で拡張してもよく、意図された受容患者又は蹄帯動脈もしくは静脈に直接得てもよい。

【0028】乾燥後、乾燥及び再水和後又は乾燥、再水和及び再構成後に、加工処理された組織移植片は適切な病院又は治療施設に輸送される。製品の最終組成の選択は具体的な意図された臨床適用に依存している。

【0029】本発明の実施において、適切な組織を加工処理前に得ることが重要となる。ヒト死体組織は、米国内における約100の組織バンクから入手できる。加えて、ヒト組織は病院からも直接入手できる。署名された告知に基づく同意書が移植用の組織を採取するためドナーの家族から要求される。動物組織はいくつかの内加工会社から入手できる。採取される組織の具体的タイプは本発明の方法で限定していない。しかしながら、組織の加工処理は特定の獲得操作の使用とある機械的及び生化学的障害現象を防止するため安定化溶液での処理により高められる。

【0030】採取された組織は獲得時に、様々な機械的及び生化学的障害現象をうけることがある。細胞成分及び細胞外基質は、双方ともこれらの現象中に損傷される。細胞外基質に対する障害は細胞成分の不安定化の結果として主に生じる。本発明の意図はこの細胞成分を最終的に除去して細胞外基質を最良に保存することであり、従って安定化溶液が初期の細胞とその後の細胞外基質の障害を最少に抑えるように処方される。細胞外タンパク質及びコラーゲン基質はタイプIコラーゲン、タイプIIコラーゲン、タイプIIIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、エラスチン、ラミニン、テニンシン及びアクチニのような様々なタンパク質とプロテオグリカンを含む天然三次元格子からなる。

【0031】細胞障害における初期現象は、低酸素症

13

(体の組織に達する酸素の欠乏)と代謝及びエネルギー産生を維持する上で細胞に要求される栄養素供給の欠如である。低酸素症、特に低酸素症及び再灌流は膜及びタンパク質を含めた細胞成分と反応する酸化種、過酸化水素のようなラジカルを発生させる。その後に脂質過酸化及び架橋の変化が細胞の構造的及び機能的混乱を起こして、細胞外基質中への(通常リソソム中に含有される)自己分解酵素の放出を開始させる。基質に対する障害は、2倍の酸化体障害及び酵素分解である。栄養素供給の欠如は、細胞が低酸素障害に対するその防御メカニズムを維持する上で必要なエネルギー要求をまかなえないため、これらの現象を増幅する。これらの現象を最少に抑える上でいくつかのアプローチが可能である。これらにはスーパーオキシドアニオン及び過酸化水素を中和する酵素(スーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼ)又は他のラジカル種と直接反応してそれを中和できる化合物の使用がある。これらの化合物は酸化防止剤と呼ばれ、それらには三級ブチルヒドロキノン(BHT)、 $\alpha$ -トコフェロール、マンニトール、ヒドロキシ尿素、グルタチオン、アスコルビン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)とアミノ酸のヒスチジン、プロリン及びシステインがある。酸化防止剤に加えて、安定化溶液は正常生化学経路に対する低酸素変換を阻害する剤、例えばキサンチンデヒドロゲナーゼを阻害するアロプリノール、リボキシゲナーゼ阻害剤、カルシウムチャンネル遮断薬、カルシウム結合剤、鉄結合剤、代謝中間体及びアデノシン三リン酸(ATP)生成の基質を通常含有する。

【0032】安定化溶液は、一種以上の抗生物質、抗真菌剤、プロテアーゼ阻害剤、プロテオグリカン及び適切な緩衝剤も通常含有する。抗生物質は細菌増殖とその後に組織感染を阻止又は防止する上で必要である。抗生物質はペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、バシラシン及びバンコマイシンの群から選択してよい。更に、アンホテリシンB、ニスタチン及びポリミキシンを含めた抗真菌剤も用いてよい。

【0033】プロテアーゼ阻害剤は、放出された場合に細胞外基質を不可逆的分解と化学誘引因子の放出を起す内在タンパク質分解酵素を阻害するため、安定化溶液中に含有される。これらの化学誘引物質は、細胞外基質に更に障害を与える非特異的免疫応答を生じる多形核白血球、マクロファージ及び他のキラー細胞の関与を求める。プロテアーゼ阻害剤はN-エチルmaleimid(NEM)、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレンジアミン四酢酸(2-アミノエチルエーテル)-N, N, N'-四酢酸(EGTA)、ロイペプチン、塩化アンモニウム、高pH及びアポプロチニンからなる群より選択される。

14

【0034】プロテオグリカンは、溶液と組織とのコロイド浸透圧バランスを保ち、それにより組織から溶液への内在プロテオグリカンの拡散を防ぐため安定化溶液中に含有される。内在プロテオグリカンはコラーゲンベース結合組織生理学上で様々な機能に役立っている。細胞増殖及び分化の調節(例えば、ヘパリン硫酸及び平滑筋細胞)に関与するか又は一方それらは(心臓弁に関するような)病的な石灰化を防止する上で重要である。プロテオグリカンは結合組織機能に与る基本的なコラーゲン及びエラスチン合成と改造の複雑な調節にも関与している。プロテオグリカンはコンドロイチン硫酸、ヘパリン硫酸及びデルマトラン硫酸の群から選択される。含有させてもよい非プロテオグリカンアズモチック(asmti)はデキストラン及びポリビニルピロリドン(PVP)のようなポリマーとグリシン及びプロリンのようなアミノ酸である。

【0035】安定化溶液は適切な緩衝剤も通常含有する。緩衝剤の性質は加工処理技術のいくつかの面で重要である。低浸透圧強度緩衝剤のクリスタロイドは、伏在静脈獲得時に生じる障害と角膜貯蔵に関係していた。至適pH及び緩衝能力が(下記)低酸素障害の産物に対して不可欠である。この関係において有機及び炭酸水系緩衝剤は独特な利点を有している(赤血球貯蔵において、グリシン及びグルコース含有酢酸・クエン酸緩衝液は貯蔵寿命を伸ばして細胞完全性を維持する上で有効であることが示された)。2-(N-モルホリン)エタンスルホン酸(MES)、3-(N-モルホリン)プロパンスルホン酸(MPOS)及びN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)からなる群より選択される有機緩衝剤を用いることが好ましい。一方、リン酸、炭酸水素及び酢酸塩・クエン酸塩を含有した低塩又は生理緩衝液もある適用上より適切であろうと思われる。

【0036】もう1つの好ましい態様において、安定化溶液の成分は、痙攣、低酸素症、低酸素再灌流、リソソム酵素放出、血小板付着、生殖不能及び緩衝液状態のような血管組織の採取時に生じる一以上の現象に向けられる。血管壁の平滑筋ライニングの不随意収縮は、機械的伸縮又は膨張と、典型的には低酸素症(低酸素)状態下で放出されるある内皮細胞由来収縮因子の化学的作用に起因する。この不随意収縮は筋肉自体、内皮細胞及び周辺細胞外基質に不可逆的障害を与える。この理由から、血管用の安定化溶液はカルシウム-伝伝子関連ペプチド(CGRP)、ババペリン、ニトログリシドナトリウム(NaNP)、H7(タンパク質キナーゼC阻害剤)、カルシウムチャンネル遮断剤、カルシウムキレート剤、イソプロテノール、フェントラミン、ピニジン、イソブチルメチルキサンチン(IBMx)、ニフェディン及びフルラジンの群から選択される1種以上の平滑筋弛緩剤を含有する。採取された組織は直ちにこの安

定化溶液にいれられ、更に加工処理する前に輸送及びいずれかの貯蔵中に4℃で維持される。

【0037】本発明の実施において、採取された組織は抗原細胞成分を除去するため加工処理されることが不可欠である。

【0038】脱細胞化は、ある塩、界面活性剤又は酵素中におけるインキュベートを含めたいくつかの化学処理を用いて行うことができる。PA、フィラデルフィア、ローム・アンド・ハース社(Rohm and Haas Company)の商標製品、界面活性剤トリトンX-100の使用は米国特許第4,801,299号明細書で詳述されるように細胞膜を除去することが明らかにされている。他の許容される脱細胞化界面活性剤としては、ポリエチレン(100)グリコールテトラオクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレートおよびポリオキシエチレン(80)ソルビタンモノオレート(Tween 20および80)、デオキシコール酸ナトリウム、3-[(3-クロラミドプロピル)ジメチルアミノ]-1-プロパンスルホネート、オクチルグルコシド及びドデシル硫酸ナトリウムがある。

【0039】一方、格別限定されないが、ジスパーゼI、トリプシン及びサーモリシンを含めた酵素も脱細胞化を行うために用いてよい。これらの酵素はそれらの効果を達成する上でコラーゲン及び細胞間結合の異なる成分と反応する。ジスパーゼIIは基底膜の緻密層及びアンカー繊維の成分であるコラーゲンタイプIVを攻撃する。サーモリシンは、ケラチン細胞の基本層のヘミデスモソームにおいて球根状フェムフィゴイド(pemphigoid)の抗原を攻撃する。トリプシンは細胞間のデスモソーム複合体を攻撃する。これら酵素のタンパク質分解性質のために、細胞除去が基底膜複合体を含めた細胞外基質にさほど障害なしに生じるような注意が払われねばならない。これは濃度、時間及び温度の関数である。かなり長時間又はかなり高濃度で用いられた場合、例えばジスパーゼIIは真皮から基底膜複合体を完全に除去することができる。

【0040】例えば、ヒト死体皮膚において37℃、1.0単位/mlで90分間にわたるジスパーゼIIは基本層以外のすべてのケラチン細胞を除去するが、一方で一部の障害が基底膜複合体で既に生じている。4℃、200µg/mlで30分間にわたるサーモリシンは、一部の障害において基底膜複合体への障害なしに本質的にすべてのケラチン細胞を除去するが、但しこれはドナー毎に異なり、基底膜障害の証拠が一部のドナーでみられる。ヒト皮膚の場合16時間、ブタ皮膚の場合48時間にわたる塩化ナトリウム1モル中皮膚のインキュベートにより、基底膜複合体への障害なしに表皮及び真皮をきれいに分離できる。

【0041】塩、界面活性剤及び酵素に加えて、加工処

理溶液は細胞外基質の分解を防止するためあるプロテアーゼ阻害剤も含有する。コラーゲンベース結合組織は細胞外タンパク質基質中に内在酵素としてプロテアーゼ及びコラグナーゼを含む。更に、平滑筋細胞、繊維芽細胞及び内皮細胞を含めたある細胞タイプはリソソームと呼ばれる小胞の内部にいくつかのこれら酵素を含む。これらの細胞が低酸素症のような現象により障害をうける場合、リソソームは破裂してそれらの内容物が放出される。結果的に、細胞外基質はタンパク質、プロテオグリカン及びコラーゲン分解から重度の障害をうけることができる。この障害は、細胞死を起す上で不十分な酸素に関する減少がコラーゲン基質に顕著な障害を与える心臓虚血の臨床ケースで明らかのように重度である。更に、細胞外分解の結果として、死んだ又は障害をうけた組織を除去すると考えられる多形核白血球及びマクロファージを含めた炎症細胞を求める化学誘引物質を移植片に放出する。しかしながら、これらの細胞も非特異的な炎症反応により細胞外基質破壊を永続させる。したがって、加工処理溶液はこのような障害を防止するためN-エチルマレイミド(NEM)、フェニルメルチルスルホニルフルオリド(PMSF)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレンジアミン四酢酸(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸、塩化アンモニウム、高pH、アポロチニン及びロイペプチンの群から選択される一種以上のプロテアーゼ阻害剤を含有する。

【0042】塩、界面活性剤、酵素及びプロテアーゼ阻害剤に加えて、加工処理溶液は通常適切な緩衝剤を含有する。これは前記された多数の異なる有機緩衝剤のうち一つであってもよい。2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)及びN-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)からなる群より選択される有機緩衝剤を用いるのが好ましい。一方、グリシンと共に又はそれなしにリン酸、炭酸水素、酢酸、クエン酸、グルタミン酸塩を含有した低塩又は生理緩衝液もある適用上より適切であろう。低塩又は生理緩衝液は、生細胞による移植片の侵入を更に支持し、このため血管新生を含めた細胞侵入が移植皮膚基質のような移植片の初期生存にとり必須である場合に更に好適である。

【0043】加工処理溶液は、移植に際して刺激性又は炎症性である化学物質を含有しているかもしれないため、加工処理溶液は組織から完全に洗い落とされることが本発明の実施にとり重要である。好ましい態様において、この洗浄は加工処理溶液の残物が移植と適合するレベルに減少されるまで適切な緩衝液を十分に交換して洗い落とすことにより行う。一方、加工処理溶液の成分は特定の阻害剤で、例えばジスパーゼIIはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)又はトリプシンは血清で中和され

17

【0044】組織の低温調製又は凍結は完全な洗浄後に行う。生物物質は慣用的手段による凍結及び解凍時に又は凍結乾燥後に通常かなり劣化をうける。したがって、これらのステップはこの出願に記載された方法により凍結保護溶液中における加工処理脱細胞化組織のインキュベート前に回避されるべきである。

【0045】脱細胞化組織を低温保存する最初の工程は、凍結ステップ前に低温溶液中で組織をインキュベートすることを含む。低温溶液は水との組合せで膨張又は収縮をいずれもうけないう有機溶媒と共に又はそれなしで適切な緩衝剤、一種以上の凍結保護剤及び/又は乾燥保護剤を含む。

【0046】適切な緩衝剤は採取組織の獲得又は脱細胞加工処理で利用される前記緩衝剤のいずれであってもよい。

【0047】適切な緩衝剤に加えて、低温溶液は凍結保護剤を通常含有する。凍結保護剤は組織のガラス転移温度範囲を上昇させ、それにより凍結状態で組織の最良安定性を可能にする。この範囲の上昇により、組織は更に速い速度で乾燥できる。凍結保護剤は所定冷却速度で氷形成も減少させて、ある程度ガラス質化（結晶格子の不存在）を起すが、但し更に大きな程度で立方晶氷を形成させる。凍結保護剤の不存在下における超急冷の方法によれば、ガラス質化は非常に小さなサンプルでしか及び数ミクロンの深さでしか達せられない。そのときには立方及び六方晶氷のみがみられる。ガラス質化された水及び立方晶氷は六方晶氷よりも細胞外基質成分に障害を与えない。しかしながら、一部のケースにおいては六方晶氷を生じさせることが許容される（例えば、皮膚の加工処理）。ある程度の六方晶氷形成はそれが組織の機能的特徴を損傷させない場合に許容される。心臓弁は内臓後に反復応力に付れる。このため例えば真度よりも氷晶障害に耐えられない。

【0048】様々な凍結保護剤が本発明で使用できる。これらにはジメチルスルホキシド（DMSO）、デキストラン、スクロース、1、2-プロパンジオール、グリセロール、ソルビトール、フルクトース、トレハロース、ラフィノース、プロピレングリコール、2、3-ブタンジオール、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルピロリドン（PVP）、ブリン（又は他のタンパク質安定剤）、ヒト血清アルブミン及びそれらの組合せがある。適切な凍結保護剤は、凍結点を低下させ及び/又はガラス質相を得る上で必要な冷却速度を減少させる分子を構築する。それらはガラス質状態のガラス転移温度範囲も高める。

【0049】低温溶液で生物組織を一種以上の乾燥保護化合物に暴露させてもよい。乾燥保護剤は定義によれば乾燥状態でサンプルを安定させる。一部の凍結保護剤は乾燥保護剤としても作用する。一部の化合物は可変で各活性を有し、例えばトレハロースは主に乾燥保護剤で

18

あって弱い凍結保護剤でもあり、一方スクロースは主に凍結保護剤であって弱い乾燥保護剤でもある。例えば、トレハロース及びポリヒドロキシ炭水化合物はタンパク質のような高分子と結合して安定化させる。様々な乾燥保護剤が本発明で使用できる：スクロース、ラフィノース、トレハロース、亜鉛、ブリン（又は他のタンパク質安定剤）、ミリスチン酸、スベルミン（ポリアニオン系化合物）及びそれらの組合せ。

【0050】0.5 M ジメチルスルホキシド、0.5 M プロピレングリコール、0.25 M 2,3-ブタンジオール、1.0 M ブリン、2.5% ラフィノース、15% ポリビニルピロリドン及び15% デキストラン（MW 70,000）の組合せは、 $-250^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  程度の冷却速度と併せたとき、凍結及び乾燥双方の後にヒト伏在静脈の構造の完全性を維持する上で有効であることが示された。本発明者らは凍結保護剤、乾燥保護剤及び緩衝剤のこの溶液が心臓弁のような更に大きな組織サンプルで用いられた場合にその組織が凍結及び/又は乾燥後にクラックを生じること明らかにした。この現象は水をホルムアミドのような有機溶媒で置き換えることにより克服できる。そのパーセント（50%）は凍結時に膨張又は収縮しない溶媒、水、凍結保護剤及び乾燥保護剤のその組合せとして決定される。ホルムアミド（ $\text{HCONH}_2$ ）は炭水化合物ベース凍結保護剤を溶解する一つの炭素、親水性、有機溶媒である。それはジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール及びピロリジンのような類似性質を有する他の有機溶媒で置き換えてよい。

【0051】生物サンプルは、それらが急速に冷却される前に、数分間〜数時間にわたり低温溶液中でインキュベートされる。一般に、低温保存は事項の連続的順序で行われる。組織は最初に低温溶液の成分の完全浸透が済むまで所定期間（0.5〜2時間）にわたり低温溶液中でインキュベートされ、しかる後サンプルはそれが安定な通常 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の温度まで凍結される。

【0052】本発明者らは、電子顕微鏡分析用に生物サンプルを調整する方法として、低温固定と超低温分子蒸留乾燥の開発に携わってきた。このアプローチを有効化するため、我々は乾燥の特徴付けと凍結サンプル内に存在する氷相との関係について研究した。

【0053】純粋に物理的又は乾燥加工処理技術による電子顕微鏡観察用のサンプル調製は、特に究極的目的が超微細構造及び生化学双方の分析である場合に、理論的に有効である。初期の電子顕微鏡観察以来、細胞及び組織サンプルに関する凍結及び真空乾燥又は凍結乾燥（FD）プロセスを改良し、開発するいくつかの試みが行われてきた。

【0054】その結果得られた概念的利点及び進歩にもかかわらず、電子顕微鏡観察用の凍結乾燥は日常的に広

く適用しうる技術の地位をなす得てはいない。いくつかの理由が挙げられる。第一に、超微細構造保存は、従来の化学、温湿加工処理技術又は凍結置換のようなハイブリッド技術と比較した場合に劣ることが多い。第二に、サンプル採取、温度コントロール、真空パラメータ及び最終加工処理プロトコルに関して多数の実際の問題がある。第三におそらく最も基本的なことは超微細構造障害を避けるため、 $-12.3^{\circ}\text{C}$ 以下の温度での乾燥が不可能又は非現実的のいずれかであるという考えである。これら現実的かつ理論的な弊害の結果として、低温凍結乾燥の散発的研究のみが報告されてきた。

【0055】この理論的障壁の基礎は、下記Knudsenの式で表されるように、動力学的ガス理論及び予昇華速度の適用からくる：

【0056】

【数1】

$$J_s = NPs \left( \frac{M}{2\pi RT} \right)^{0.5}$$

式中  $J_s$  = 昇華速度

$N$  = 蒸発係数

$P_s$  = 飽和蒸気圧

$Q$  = 普遍ガス定数

$T$  = サンプルの絶対温度

$M$  = 水の分子量。

【0057】理論的に理想的な乾燥条件の場合、この式は昇華速度がサンプル内における水の飽和蒸気圧に正比例してサンプルの絶対温度に反比例することを示している。サンプルの温度は明確に規定しうるが、飽和蒸気圧は更に複雑なパラメータである。

【0058】この式の以前は、理論的に決定された飽和蒸気圧を用いていた。しかしながら、これらの理論的蒸気圧は溶解の潜熱を含み、このため六方晶氷のみに適用しうる。これらの理論値に基づく計算から「150 Kにおいて1 mm厚の氷層が凍結乾燥で完全に除去されるまでには3.5年要する。したがって170 K以下の温度で凍結乾燥を試みることは非現実的である。」というような結論に達した。

【0059】しかしながら、六方晶以外のいくつかの氷相は凍結保護剤の冷却及び使用方式に応じてサンプル内に共存できる。これらの異なる相は蒸気凝縮、高圧適用及び超急冷を含めいくつかの方法により得ることができる。

【0060】現在認識される氷の主要な相は非晶質、立方晶及び六方晶である。これらの氷相は異なる安定性を示すが、これは飽和蒸気圧も異なることを示唆する。双方の相が共存しうる温度での蒸気凝縮水に関して、非晶質氷の飽和蒸気圧は立方晶氷の場合よりも1~2 log高いことがわかった。

【0061】クヌーセン式におけるこれら実験的測定飽和蒸気圧を適用すれば、1 mmの非晶質氷の場合で150

Kにおける乾燥時間を3.5年から0.035年、即ち12.7日に減少させる。生物サンプルの急冷技術は約5  $\mu\text{m}$ での相を生じることから、この成分の乾燥時間は単にクヌーセン式に基づくとし、5時間程度であろう。このため、実際の乾燥時間に関して超低温で乾燥するための理論的障壁は克服できる。

【0062】しかしながら、乾燥は静的でなく、速度依存性のプロセスである。異なる氷相の飽和蒸気圧に加えて、温度増加に伴う相毎の転移速度についても説明しなければならない。電子顕微鏡観察サンプル調製のため、乾燥は理想的にはいかなるこのような転移又は脱ガラス質化もなしに起きるべきである。これらの転移速度に関する情報は限定されている。非晶質から立方晶への転移は $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-130^{\circ}\text{C}$ 範囲の温度に強く依存する不可逆的プロセスとして起き、下記式で表されることがわかった：

$$t = 2.04 \times 10^{11} \times \exp(-0.465T)$$

立方晶から六方晶への転移は温度依存性が低く、 $-120^{\circ}\text{C}$ ~ $-65^{\circ}\text{C}$ の範囲で起き、下記式で表される：

$$t = 2.58 \times 10^{11} \times \exp(-0.126T)$$

面白いことに、サンプル温度が5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で増加された場合、非晶質から立方晶への転移は $-130^{\circ}\text{C}$ 近くで急激な現象として生じた。

【0063】上記データに基づき、転移速度と飽和蒸気圧から具体的な氷相が特定温度で乾燥される深さを決定する。 $-160^{\circ}\text{C}$ における非晶質氷の場合、乾燥時間は205日である。実験的測定飽和蒸気圧及びクヌーセン式の外挿法に基づけば、これは26  $\mu\text{m}$ クロン乾燥させる。 $-140^{\circ}\text{C}$ において、転移時間は28分であり、理想的条件下で0.8  $\mu\text{m}$ 乾燥させる。 $-160^{\circ}\text{C}$ 以下、即ち転移の開始前においては、あるにしても水分子の移動動力学的エネルギー、ひいてはあるにしても乾燥をほとんど予想できない。

【0064】これらの考慮に基づき、転移乾燥、即ち多数の氷相を含むサンプルの場合に各相をその転移時に連続的に乾燥しうるといふ仮説を立てることができる。乾燥される各相の量は乾燥装置の効率、加熱速度及び乾燥シェルのインピーダンスを含めた多数のパラメータに明らかに依存する。

【0065】低温保存

低温保存とは、凍結現象に伴う損傷に抗して、細胞又は組織構造を保存することである。自然低温保存は生物の適応代謝に基づいており、細胞構造、組成及び代謝バランスに関する変化が凍結からの耐性を高める。細胞生存力又は組織超微細構造が冷却後に保存される研究室的実験では、二つの方法が利用できる。第一はサンプルを超急冷することであり、その際には組織液はガラス質化され、即ち氷晶は存在しない。第二は、ある程度凍結保護する化学添加剤を配合することである。化学物質はグリセロール、プロリン、糖及びアルコールのような天然凍

結保護剤からジメチルスルホキシド (DMSO) のような有機溶媒、ポリビニルピロリドン (PVP)、デキストラン及びヒドロキシエチルデンプン (HES) のような高分子量ポリマーまでわたる。

【0066】細胞及び組織のガラス質化はサンプルが冷却される速度及び組織自体の透湿性により制限される。物理的制限のために、最先端技術を用いて組織の薄層のガラス質化を達成できるだけである。これは構造及び機能障害を起こさずに生物サンプルを冷却及び貯蔵する試みにおいて、凍結保護及び冷却速度操作のため化学添加剤というアイデアを非常に魅力的にする。

【0067】凍結による生物サンプルに対する損傷は、一部は長い間知られているが、その他は最近になって理解された基本的な物理的及び生物学的原理に従う。生物サンプルにおける凍結損傷のメカニズムに関する本格的な研究は、本第二四半世紀まで始まらなかった。これらの初期研究は氷晶による物理的障害が凍結損傷の主原因であるという考えに支配されていた。脱水の効果並びに細胞外溶質の濃縮と細胞及び組織障害との相互関係が明らかにされた。細胞凍結損傷に関する“二因子”仮説は、細胞損傷が細胞外氷による溶質の濃縮又は機械的損傷を起こす細胞内氷の形成のいずれかの結果であることを示した。

【0068】グリセロール及び他の小極性化合物の作用は、細胞内に浸透して総括的な作用を発揮することであると解釈されてきた。浸透化合物の総括的作用が0℃以下の温度で水を液状に維持する割合に応じて、細胞液の容量増加が維持される。これは非凍結細胞液における毒性電解質の過濃縮を避ける。同様の影響は外液でも生じる。この関係において、総括的作用は、氷との接触で溶液の凍結点を低下させるという点で外来溶質による作用と呼ばれる。十分な保護化合物が存在すれば、障害を起こす反応が細胞により耐えられるほど十分遅くなるように温度が低くなるまで、塩濃度は臨界的障害レベルまでは上昇しない。氷晶の機械的成長と溶質濃縮及びpH変化による化学的障害の双方による組織基質に対する障害の類似概念も適用することができる。

【0069】非浸透凍結保護剤は、スクロースからPVP、HES及びデキストランのような大ポリマー物質までサイズが様々である。非浸透物質は前記総括的メカニズムによるよりも、他の手段により作用することが示唆されている。大きな分子の役割は浸透圧作用による脱水であると考えられる。大部分の水が浸透圧差により細胞から吸引される場合、遊離水は致死因子とよくみなされる細胞内氷晶化にほとんど利用できない。組織において、ポリマー物質は水分子を結合及び構築することにより作用するのである。

【0070】凍結保護化合物の存在下における冷却速度は凍結損傷に関して非常に重要な因子である。通常細胞に関して徐冷却は高冷却速度よりも良いが、その理由

は後者が細胞内氷形成を促進するからである。これは含有細胞水が凍結する前に水が細胞から逃げるための時間が不十分であるために起きる。徐速冷却のときは細胞外氷が最初に生成して細胞の脱水を起こし、凍結保護剤の存在と一緒に細胞内氷形成を防止する。組織基質サンプルの場合には全氷晶形成度に関する全体的減少と更に直接的な関係がある。

【0071】浸透化合物は凍結プロセスであり早く細胞から水を過剰輸送させないことで作用すると考えられるが、一方非浸透化合物は細胞周囲の溶液を希釈する束一的効果と共に細胞で脱水効果を有する。しかしながら、これらの記載はいずれも全説明をしているわけではない。

【0072】HES及びPVPのような溶質は、非浸透スクロースよりも単に大きなだけの分子量の全体的に非浸透の水吸引化合物である。大きな分子量ほど重量ベースで考えた場合に、このような化合物を浸透圧的及び総括的に有効ではないものとするはずである。しかし濃溶液の場合、化合物の総括的作用は濃度との単純な直線関係に基づき予想されるよりもかなり大きいことが示された。

【0073】凍結自体以外の凍結組織に対する障害源は、多数の凍結保護剤の浸透圧及び毒性効果である。混合物で用いられる場合、一部の凍結保護化合物はDMSO及びグリセロールの混合物へのポリエチレングリコール (PEG) の添加により証明されるように、他の凍結保護剤の毒性を中和するかもしれない。本発明者らはいくつかのガラス質化溶液 (VS) を開発した。

【0074】これら溶液の個別的組成の毒性が試験された。混合物のとき、毒性効果は相当濃度でいずれか成分が単独で用いられる場合よりも低かった。得られる溶液は細胞培養物に対して無毒性であり、液体窒素に投入された場合にガラス様で視覚的に透明なままである (即ち、目視しうる氷晶が形成されない)。

#### 【0075】ガラス質化溶液1

ジメチルスルホキシド (DMSO)	0.5M
プロピレングリコール	0.5M
2, 3-ブタンジオール	0.25M
プロリン	1.0M
ラフィノース	2.5%(w/v)
ポリビニルピロリドン (PVP)	15%(w/v) (平均M.W.=40,000)
デキストラン	15%(w/v) (平均M.W.=40,000-70,000)。

【0076】下記混合物からなる改質ガラス質化溶液 (VS<sub>2</sub>) も開発された:

DMSO	0.5M
プロピレングリコール	0.5M
2, 3-ブタンジオール	0.25M
ラフィノース	10%(w/v)

23

トレハロース	6%(w/v)
スクロース	6%(w/v)
PVP	12%(w/v) (平均M.W.=40,000)
デキストラン	12%(w/v) (平均M.W.=40,000-70,000)。

【0077】開発されたもう1つの改質ガラス質化溶液(VS.)は下記混合物からなる:

DMSO	0.5M
プロピレングリコール	0.5M
2,3-ブタンジオール	0.25M
ラフィノース	2.5%(w/v)
スクロース	12%(w/v)
PVP	15%(w/v) (平均M.W.=40,000)
デキストラン	15%(w/v) (平均M.W.=40,000-70,000)。

【0078】第四の改質溶液(VS.)が開発された。この溶液はそれが50%ホルムアミド有機溶媒を含有する点で異なる。この混合物は凍結で膨張も収縮もせず、このため大きな組織サンプルを凍結する場合にクラックを生じさせない。それは下記混合物からなる。

ホルムアミド	50%(w/v)
70Kデキストラン	15%(w/v)
ラフィノース	2.5%(w/v)
40K PVP	15%(w/v)
スクロース	12%(w/v)。

【0079】要約すると、化合物の凍結保護性質に影響を与える因子は、(a)化学的組成物、(b)低毒性、(c)分子サイズ及び浸透能力、および、(d)混合物中における他の化合物との相互作用である。

【0080】凍結保護剤の物理化学的效果は、(a)総合的ベースにおける基質及び細胞質の平衡凍結点の降下、(b)均質氷核形成温度の降下、(c)溶液の粘度及び熱拡散性の変化による氷晶成長の速度減少、および、(d)浸透圧作用による細胞の脱水効果である。

#### 【0081】冷却パラメーター

本発明による生物学的懸濁物の低温調製のための様々な冷却プロセスが使用できることに留意することが不可欠である。本発明の好ましい態様において、急冷は適正な氷晶ブレンドを得る上で必須と考えられる。本発明の最も好ましい態様において、生物サンプルで実質的割合の非晶質氷を形成するガラス質化操作が用いられる。以下で開示されるように、用いられる冷却の形にかかわらず、非晶質相水、立方氷晶及び六方氷晶が最終品中に存在すると考えられる。冷却方法は冷却された低温溶液でみられる氷晶タイプの分布に明確な圧力を与える。

#### 【0082】乾燥パラメーター

分子蒸留乾燥による凍結生物サンプルの制御的乾燥の目的は、更に乾燥プロセス時に生じる機械的又は化学的障害なしにサンプルから水を除去することである。これら

24

は適切な乾燥条件の使用により2つの基本的な障害現象を避けることを要する。第一は、大きくより安定でかつより破壊的な結晶への転移なしに氷晶相から水を除去することである。第二は、固体であるが非結晶性の水又は水-溶質混合物から、これら両相の融解又は結晶化なしに水を除去することである。この第二の要素は非晶質状態で存在する水、共融物中溶質と一緒にの水又は水を結合及び構築する化合物と一緒にの水に関し、このため凍結プロセス時にその結晶化を妨げる。したがって、ガラス質水は超急冷純水のとき低いエネルギー及び安定性であり又は低温保護剤と共に中間冷却速度で行われるとき高いエネルギー及び安定性である。

【0083】これら現象の発生を避ける上で制御的乾燥に欠かせない特徴の多くは重複している。これに関する理由は各形の氷が結晶であろうと又は凍結保護化合物に結合しようとする特定のエネルギー状態を有し、乾燥のための必要条件を決定するのがその形態よりもむしろこのエネルギー状態であるためである。例えば(1)中間冷却速度で純水を冷却することで得られる立方氷水のサンプル及び(2)水をグリコールと45%vol:volまでミックスして中間速度で冷却することで得られるガラス質化水を考慮せよ。第一のサンプルは結晶であり、乾燥の目的は六方氷水への転移なしにこの状態から水を除去することである。第二のサンプルは非晶質固体であり、乾燥の目的は後の沸騰でガラスから液体への融解なしにこの相から水を除去することである。立方氷の場合、その転移の開始は-130°Cであり、転移の速度は温度依存性であって、-130°Cで非常に遅く、-90°Cで非常に速い。45%グリコール-水の場合、ガラス転移温度は-120°Cであり、融解の開始を表す。融解プロセスは-120°Cで非常に遅く、温度依存性であって、-90°Cで非常に速くなる。

【0084】立方晶から六方晶への転移又は45%グリコール-水のガラス転移の開始前に、これらの相における水の飽和蒸気圧は極端に低く、乾燥は極端に遅い速度で起きる。したがって、制御的乾燥の目的は立方氷相からその転移に際して六方氷水へのいずれか有意な転移に要するよりも少ない時間で及び45%グリコール-水相から液体へのその転移に際して何らかの認知する液体が生成する上で要するよりも少ない時間で水を除去することである。

【0085】この議論は水が立方晶、六方晶の形で結晶であるかもしれない非晶質として非結晶であるか又はいずれかの分子、即ち凍結保護剤、タンパク質、炭水化物もしくは脂質に結合されているかにかかわらず存在する水のすべての形に反復して適用できる。この概念を単純化するため、凍結生物サンプル中の水は特定のエネルギーレベルEを有するとして記載できる。凍結生物サンプルにおいて、多数の規定しうる下記エネルギーレベルの水形がある:

E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、---、E<sub>n</sub>、凍結保護剤又は他の添加剤の使用及び用いられる冷却速度はこれら異なる水形の相対的割合を決定する。各エネルギーレベルはその転移又は融解の開始温度と転移又は融解速度の温度依存性を決定する。

【0086】制御の乾燥プロセスは完全転移に要するよりも少ない時間で転移に際して各々のこれら異なる状態の水を除去できなければならない。したがって、この乾燥方式はいくつかの条件に合致することを要する。

【0087】第一に、サンプルはその最低転移温度より高い温度上昇なしに乾燥機に装填されなければならない。温度の上昇が生じるならば、これは明らかな転移が生じないように短時間でなければならない。理想的には、装填は純粋な超急冷非晶質水に関して-160℃の最低と認識しうる転移よりもかなり低い-190℃で液体窒素下で行う。しかしながらサンプルが主に-100~-130℃程度でガラス転移する立方晶水であるか又は水及び凍結保護剤の混合物であるならば、閉回路冷蔵システムが転移開始以下のサンプル温度を維持する上で十分である。

【0088】装填されると、サンプルは真空中に暴露されて、コンデンサー表面に面して直列でなければならない。これらに関する基準はサンプル中に存在する水相の性質により再度決定される。下記目標が達成されなければならない。特定相の乾燥時における室内の真空は除去される相における水の飽和蒸気圧に少くとも相当するか又はそれよりも低い水の分圧を形成しなければならない。この飽和蒸気圧は水相の性質及びその温度に依存している。このため、-160~-130℃の転移範囲内における純粋な非晶質水の場合大体の飽和蒸気圧は各々 $8 \times 10^{-12}$  mbar (-160℃) 及び $5 \times 10^{-12}$  mbar (-130℃) である。この同温度範囲-160~-130℃における非晶質から立方晶水への転移時間が $5 \times 10^5$  ~5分間であるため、乾燥は-150~-140℃程度の温度に達するまで非常に速く、 $5 \times 10^{-10}$  ~ $2 \times 10^{-8}$  mbarの真空を要する。これは1つの極例を表す。

【0089】立方晶水のとき、その飽和蒸気圧は非晶質水の場合よりも1 log低い程度であるため、もしあるにしても乾燥はその転移開始よりも低い-130℃でほとんど起きない。転移範囲-130~-100℃のとき、立方晶水の飽和蒸気圧は約 $5 \times 10^{-10}$  ~ $9 \times 10^{-11}$  mbarである。立方晶から立方晶への転移時間は各々700及び109分間である。したがって、飽和蒸気圧は乾燥のための真空要求条件を決定し、存在するすべての水相に適用できる。同様の真空基準はすべての相に適用されるわけではなく、むしろ相依存性であることに留意することは重要である。

【0090】真空の第二基準は形成される中間自由路がサンプルとコンデンサー表面との距離を超えていること

である。理想的には、これは10倍過剰であるべきである。コンデンサー表面はサンプルから除去される水相の開始転移温度よりも低い温度でなければならず、その結果乾燥時にこの表面で凝縮される水の飽和蒸気圧はサンプル内における水相の場合よりも著しく低い。理想的には、これは大ききで3程度低いべきである。多数の水相を含むサンプルの場合、コンデンサー表面の温度は除去される最も安定性の低い残留水相の転移開始よりも低いままであるべきである。理想的には、コンデンサーもサンプルに面して整列しているべきである。

【0091】サンプルが装填され、真空及びコンデンサー表面に暴露されると、サンプル及びサンプルホルダーは水分子の移動性を増しひいてはそれらの逸速を起こすように加熱されなければならない。これは多数相含有サンプルの乾燥又は水のエネルギーレベルにとり必須かつ重要な要素である。サンプルの温度は正確に知らねばならない。サンプル加熱の温度及び速度のコントロールは正確に制御されなければならない。これはサンプル中における水の各相の乾燥が連続的であることを保証する上で必要である。

【0092】このためエネルギーレベルE<sub>1</sub>及びE<sub>2</sub>、---E<sub>n</sub>。(E<sub>1</sub>は最も安定性が低い)の水の多数相を含むサンプルの場合、E<sub>1</sub>がE<sub>2</sub>へのその転移前、E<sub>2</sub>がE<sub>3</sub>へのその転移前等々に除去されるような速度で加熱が行われなければならない。これには連続速度において又は昇華が下記で決定されるように生じるような一定温度レベルで保つことにより非平衡乾燥条件と加熱を要する：

【0093】

【数2】

$$Js = NPs \left( \frac{M}{2\pi QT} \right)^{0.5}$$

式中J s = 昇華速度g/cm.sec

N = 蒸発係数

P s = 飽和蒸気圧

M = 水の分子量

Q = 普温ガス定数

T = サンプルの絶対温度。

【0094】これは特定相が除去されるための転移速度と一致する。例えば、非晶質から立方晶への転移速度は以下で示される：

$$t = 2.04 \times 10^{-4} \times \exp(-0.465T)$$

一方、転移ウィンドーがT<sub>1</sub>からT<sub>2</sub>であるならば、昇華速度及び転移速度はこの間隔にわたる温度に応じて変動する。このウィンドーT<sub>1</sub>からT<sub>2</sub>への加熱速度は昇華がいかなる特定温度における転移も完了する前にサンプルの寸法全体にわたりに起きるような速度でなければならない。

【0095】こうして、制御の乾燥の目的、即ち特定相の明確な水晶成長、形成又は融解なしに各相の性質に適した条件下で水の各相の連続除去が達成される。乾燥さ



れると、サンプルはコンデンサー表面又はいずれか他の源において水から物理的又は機械的に分離され、真空又は乾燥不活性ガス中で閉鎖容器中に貯蔵されねばならない。

【0096】好ましい態様において、サンプルは氷晶形成がサンプルに障害を起す程度以下であるような適切な方法で冷却される。凍結されると、サンプルは最も不安定な氷形の転移温度以下で貯蔵される。非晶質氷の場合、これは $-160^{\circ}\text{C}$ 以下が好ましい。次いでサンプルはサンプルホルダーに装填され、 $-196^{\circ}\text{C}$ に前冷却され、分子蒸留乾燥機に移される。次いで乾燥機が閉じられ、完全真空に密封される。再結晶化を避けるため、水和サンプルはすべての操作にわたり最も不安定な氷形の転移温度以下のままでなければならぬ。

【0097】サンプルが装填されると、高真空( $10^{-4} \times 10^{-4}$  mbar)が室内で形成される。サンプルは室内の中間自由路よりもコンデンサー表面(液体窒素冷却室壁)のかなり近くにおかれる。コンデンサー温度はサンプルの場合よりも常に下でなければならぬ。非晶質サンプルの場合、コンデンサーは $-196^{\circ}\text{C}$ であることが好ましい。

【0098】次いでサンプルホルダーがプログラム制御ヒーターマイクロプロセッサ熱電対ループで加熱される。加熱プログラムはサンプルの性質に従い決定される。非晶質、立方晶及び六方晶氷を含むサンプルに関する典型的プログラムは $-180^{\circ}\text{C}$ から $-150^{\circ}\text{C}$ まで $10^{\circ}\text{C/hr}$ 、 $-150^{\circ}\text{C}$ から $-70^{\circ}\text{C}$ まで $1^{\circ}\text{C/hr}$ 及び $-70^{\circ}\text{C}$ から $+20^{\circ}\text{C}$ まで $10^{\circ}\text{C/hr}$ である。

【0099】サンプルが $20^{\circ}\text{C}$ に達すると、それは真空室内の適切な容器内部に密封され、その後で貯蔵用に出すことができる。1形態において、サンプルはガラスバイアル内にいれられ、サイクルの最後にプラスチック凍結乾燥ストッパーで密封される。分子蒸留乾燥機の操作の更に具体的な詳細は米国特許第4,865,871号明細書に記載されている。

#### 【0100】再構成

生物組織の凍結及び乾燥は高分子コンホメーションを通常安定化させる結合力に大きな物理的応力を与える。この不安定化効果に関与するのは溶液が凍結するときにおける電解質濃度及び生じうるpH変化の増加である。結果的に、ある酵素の失活及びタンパク質の変性を含めたサンプルに対する改質が起きるかもしれない。

【0101】乳酸デヒドロゲナーゼに関する研究は凍結及び解凍が生物活性の変化に伴いテトラマー-酵素からサブユニットへの解離を起すことを示した。解離は凍結時におけるイオン強度及びpHに依存することがわかった。

【0102】L-アスパラギナーゼの四次構造を調べる他の研究ではこの酵素が凍結乾燥された場合に活性テトラマーから不活性モノマーに解離することを証明した。

このモノマー状態は高pH及び高イオン強度の緩衝液での乾燥酵素の再構成により安定化されることがわかった。しかしながら、解離は中性pH及び低いイオン強度における再構成で完全に可逆的であることが示された。他方、pHの効果は三次元構造で変化したを誘導し、再会合によりコンホメーション上拘束されたサブユニットを生じる。

【0103】これらの研究は低温保存プロトコールに用いられる処方のみならず再構成溶液にも関する至適pH及びイオン強度条件を決定する重要性について示す。こうして、最大サンプル活性及び安定性が得られるであろう。

【0104】蒸気相再水和又は温度のような再構成に関する他の可変要素も凍結及び乾燥後における活性の保持上重要である。その分野における他の研究者らは再水和の温度に依存したレクチンに対する増殖的応答又はサンプルが蒸気相で再構成されるか否かに関して顕著な差異を証明した。レクチンに対して改善された応答は凍結乾燥リンパ球が乾燥氷温度で再水和してから加温された場合に注目された。再構成のこの線形的方法是急激な再水和により誘導される浸透圧応力を減少させた。

【0105】生物組織の加工処理において、再水和ステップは獲得及び加工処理ステップで用いられる加工処理及び安定化化合物を増加させるためにも使用できる。これには低酸素症及びラジカル形成の効果を最少に抑える成分、酵素を阻害する剤、アズモチック障害を防止するプロテオグリカン、デキストラン及びアミノ酸を含めた腫脹剤がある。

【0106】加えてある環境下において、例えば血管及び心臓弁の再水和では内腔後初期に血小板凝集を阻害する成分を再水和緩衝液中に要する。生物組織が架橋状態で用いられる場合、固定液中における再水和は組織全体にわたる固定液の迅速及び均一な分布という利点を更に有する。

#### 【0107】貯蔵の考察

凍結サンプルから水の昇華は生物物質の活性成分を保存する上で優れた方法であった。しかしながら、活性の長期安定的な最良保存では乾燥プロセス及び貯蔵条件の臨界的コントロールを要する。遊離又は未結合サンプル水の除去後、構造的結合水が除去される二次乾燥プロセスが行われる。結合水はタンパク質コンホメーションの維持と密接に関係している。このため残留水分として知られる乾燥サンプル中に残存する水の量は乾燥プロセスにおいてかなり可変的であり、結果的にそれはサンプルの生存性及び安定性の双方に影響を与える。

【0108】残留水分は“残留水分率”として表示され、原サンプルの単位重量(g)当たりの残留水の重量(g)に相当する。

【0109】水の真空昇華により乾燥された生物物質は残留水分の最良含有率まで乾燥された場合に安定性増加

を示すことが通常認められる。不足して又は過剰に、即ち最良よりも上又は下である水分まで乾燥された物質は劣化増加を示す。

【0110】最良残留水分は具体的乾燥サンプルに応じて変動するが、ある安定性問題は水分のレベルが最良である場合に予想できる。サンプルの過剰乾燥、即ち乾燥安定剤を用いないで1~2%以下の残留水分のときは通常はすべての構造水を除去し、酸化によりタンパク質の露出親水性部位を飽和又は遮断してしまう。この酸化は分解を起こし、それに対応して生物活性を減少させる。他方、5%以上の残留水分はタンパク質のトランスコンホメーションに寄与する十分な量の“遊離水”がサンプル中に残留する乾燥不足について示す。ポリペプチド鎖で生じる再配列は天然タンパク質の典型的な規則的配列から更に不規則な配列にシフトさせる。これらのタンパク質振動は乾燥品の長期安定性について乏しくする。

【0111】長期貯蔵の成功には残留水分の最良レベルまでサンプル乾燥を要する。生物サンプルの不十分な乾燥とその結果は文献で示されている。真空下における水の昇華で乾燥されたインフルエンザウイルスの懸濁物の最大安定は約1.7%の残留水分率で起きた。非最良水分までの乾燥不足又は過剰乾燥はウイルスを分解させ、乾燥サンプル中における遊離及び結合水の量変動がタンパク質構造及び活性に影響を有することを示唆した。

【0112】サンプル安定性を最大化して乾燥薬剤又は試薬の製造に関する調節的要求を満足させるため、残留水分はサンプル乾燥後に決定されることが不可欠である。

【0113】いくつかの方法が残留水分を測定するために利用できる：

1. 重量測定（加熱法）- 既知量の乾燥品が加熱され、重量喪失は水分に相当する。

【0114】2. 化学的アッセイ - この方法はピリジン、二酸化イオウ及びメタノールの混合物中における水と遊離ヨウ素との反応に基づいている。終点は遊離ヨウ素が存在する場合に電量分析で検知される。 $H_2O + I_2 + SO_2 + ROH + 3RN \rightarrow 2RNHI + RN + HSO_3R$

3. ガスクロマトグラフィー

各々の方法は限界を有し、したがって水分決定でいずれか単一の方法に頼ることは賢明でない。むしろ、多数の方法が結果を確認するために用いられるべきである。

【0115】最良の残留水分まで乾燥されると、サンプルはその吸湿性及び酸化感受性のせいで真空から除去された場合になお不安定と考えられる。サンプルを大気再水和から保護して酸素との接触を最少化するため貯蔵中に測定が行われなければならない。このような保護はサンプルの長期安定性の維持にとって必須である。

【0116】文献中の証拠ではサンプルが密封されるガス条件と貯蔵温度がサンプルの長期安定性に影響を与え

ることを示している。異なるガス及び貯蔵温度を比較する研究において、サンプルが低温（-20℃）でヘリウム又は水素ガス下で貯蔵された場合にインフルエンザウイルスの最大安定が得られることが証明された。異なる貯蔵温度で他のガス又は真空下における密封は様々なレベルの安定性を生じた。本発明者らはサンプルとの酸素接触を最も有効に制限する条件がタンパク質表面で露出親水性部位の酸化を減少させることにより生物活性を著しく改善すると仮定している。適切な貯蔵パラメーター、即ち温度及びガス又は真空下における密封が長期サンプル安定性を得る上で重要である。

【0117】【実施例】

例1 移植可能な皮膚の加工処理及び貯蔵

ヒトドナー皮膚は死体からルーチンに採取され、米国内のいくつかの組織バンクで冷蔵又は凍結条件下で貯蔵される。この皮膚は広範囲の自家移植をうけている熱傷被害者にとり一時的包帯として用いられる。ブタ皮膚も同様の条件下で採取し、一時的熱傷包帯として用いられる。その未加工処理条件のとき、同種皮膚及びブタ皮膚は最終的に患者により拒絶される。この同皮膚は下記方法による加工処理にも利用できる。

【0118】ドナー皮膚を無菌条件下でデルマトームにより採取し、更に加工処理する前ペニシリン及びストレプトマイシン溶液を含有したRPMI 1640組織培養地中4℃で7日間におたり維持する。ライフ・セルズ（LifeCell's）組織加工処理センターへの輸送は、同培地中、湿潤水上で一夜輸送による。加工処理センターに到着時に、組織容器の温度が少くとも4℃であることを確認し、そうでなければその皮膚を廃棄する。容器温度、ドナー同定及び試験スクリーニングデータの確認後、皮膚を更に加工処理のため層流フードに移す。

【0119】ドナー皮膚を輸送容器から取出し、低密度ポリエチレン製サイジングサポート上にその細網側を下にしておく。適切なサイズ片のガーゼを皮膚の表皮側に加え、しかる後4×4インチ（約10×10cm）四方を超えず2×3インチ（約5×8cm）以上のできるだけ大きな角形片に裁断する。次いで皮膚を細網側を下にしてペトリ皿におき、それに1M NaClからなる脱表皮化溶液50mlを加える。次いでペトリ皿をインキュベーターに移し、ヒト皮膚の場合18~32時間及びブタ皮膚の場合35~55時間におたり37±2℃でインキュベートする。

【0120】インキュベート後、皮膚含有ペトリ皿を脱表皮化のため層流フードに移す。ガーゼを最初に取り除き、廃棄する。次いで表皮を鉗子でそっとつまみ、シートとして真皮から引き剥がす。次いで過剰の脱表皮化溶液を吸引する。次いで約1cm長のスリットを真皮の下方左隅にいて、上部及び下部表面を確認する。

【0121】次いで真皮を無菌ハンスの平衡塩類溶液からなる組織洗浄液50mlの添加により同ペトリ皿中で

洗う。次いでベトリ皿を室温(20~26℃)で5分間40±5 RPMで回転器上におく。次いでベトリ皿を層流フードに戻し、組織洗浄液を吸引するためベトリ皿から蓋を取り外した。この操作は更に2回繰り返す。

【0122】次いで真皮を脱細胞化溶液50mlで処理し、ベトリ皿を室温(20~26℃)で1時間40±5 RPMで回転器上におく。脱細胞化溶液はヒト皮膚の場合ハンタスの平衡塩類溶液中0.5%ドデシル硫酸ナトリウムからなり、ブタ皮膚の場合1mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA)を含有する。脱細胞化溶液を吸引除去する。次いで真皮を組織洗浄液50mlで洗浄する。次いでベトリ皿を室温(20~26℃)で5分間40±5 RPMで回転器上におく。組織洗浄液を吸引除去する。洗浄操作は2回繰返す。真皮を合計3回洗浄した後、前凍結溶液50mlをベトリ皿に加える。次いで皿を室温(20~26℃)で30分間40±5 RPMで回転器上におく。ヒト皮膚用の前凍結溶液はハンタスの平衡塩類溶液中7%デキストラン(70,000MW)、6%スクロース、6%ラフィノース及び1mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウムからなる。ブタ皮膚用の前凍結溶液はハンタスの平衡塩類溶液中で調製される7.5%デキストラン(70,000MW)、6%スクロース、7.5%ポリビニルピロリドン(PVP 40,000)、1.2%ラフィノース及び1mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウムからなる。

【0123】次いで新しいガゼ片を真皮の乳頭側におき、真皮を細網側が面するように反転する。真皮片の細網側からバックキングをバイオハザード廃棄容器中に捨てる。次いで約0.5~1.0cm幅ストリップのバックキング及び真皮を原サンプルから裁断する。次いでこのストリップを各々約1.0cm長の2枚のサテライト片に裁断する。すべての必要な品質確認は微生物及び構造分析を含めてこれらのサテライトサンプルで最終的に行う。

【0124】次いで組織を個々のチェックバック中に移す。組織はバックキング側を上にして白色ベント側を下にしておく。次いでチェックバックをヒートシールする。

【0125】密封された凍結乾燥バッグを-70℃の最低棚温度及び-85℃の最低コンデンサー温度を有する凍結乾燥機に移す。次いで組織を-2.5℃/minの速度で-35℃まで棚温度を傾斜させることにより凍結乾燥機上で凍結させ、少くとも10分間待つ。

【0126】乾燥サイクルはサンプルの最終残留水分が6%以下、最適には2%であるようなサイクルである。この例において、凍結真皮は下記プログラムにより乾燥する：

1. 棚温度を-2.5℃/minの速度で-35℃まで傾斜させ、2000mLにセットされた真空中で10分間待つ。

【0127】2. 次いで棚温度を1.5℃/minの速度で

-23℃まで傾斜させ、2000mLにセットされた真空中で36時間待つ。

【0128】3. 次いで温度を1.5℃/minの速度で-15℃の棚温度まで傾斜させ、2000mLにセットされた真空中で180分間待つ。

【0129】4. 次いで温度を1.5℃/minの速度で-5℃の棚温度まで傾斜させ、2000mLにセットされた真空中で180分間待つ。

【0130】5. 最後に温度を1.5℃/minの速度で20℃の棚温度まで傾斜させ、0mLにセットされた真空中で180分間待つ。

【0131】乾燥後、乾燥真皮を含む凍結乾燥バッグを乾燥窒素ガスの雰囲気下で取出し、第二の前乾燥不浸透性ポーチにいれ、同不活性環境下でヒートシールする。

【0132】(加工処理操作中及び凍結乾燥のため密封する前、サテライトサンプルを主サンプルから裁断し、更に主サンプルと同一条件下で加工処理する。移植で主サンプルの使用前、すべての必要な品質確認は微生物及び構造分析を含めてサテライトサンプルで行う。)乾燥後、サンプルは光保護環境下において上記凍結温度、最適には4℃で貯蔵する。

【0133】使用前、サンプルを無菌条件下で密封ポーチから取出し、20~37℃で平衡塩類溶液浸漬により再水和する。再水和はこの再水和溶液中で30分間のインキュベーション後に完了する。

【0134】光学及び電子顕微鏡観察による最終品の分析では正常コラーゲン結末、真皮基質におけるコラーゲン束の存在と基底膜複合体の緻密層及びアンカー繊維の構造的保存に関して構造的に無傷であることを証明した。

【0135】加工処理された真皮の細網側は細胞培養法により研究所で包皮外植片からケラチン細胞の外増殖のための基盤を与えることが証明された。加工処理された真皮は単離されたケラチン細胞の増殖を支持することも証明された。この状況下で、気液界面で培養された場合に、ケラチン細胞は正常皮膚のすべての確認しうる層に分化し、基底膜複合体を介して加工処理真皮と作用しあう。加工処理されたブタ皮膚もヒト包皮外植片からケラチン細胞の増殖を支持することが証明された。

【0136】加工処理された真皮は、メッシュ化、極薄もしくは表皮自家移植片と組合せ又は培養ケラチン細胞で再構成されたときに、全厚皮膚損傷に関していくつかの臨床的適用を有する。これらには格別限定されないが、熱傷患者、静脈性、糖尿病性又は圧力性潰瘍にかかった患者と皮膚病変部の切除後に再構築手術もしくは皮膚置換えをうける患者がある。

【0137】加工処理されたヒト及びブタ皮膚はヒト熱傷患者及び外科的誘導全厚皮膚損傷部位において繊維芽細胞侵入及び血管新生をうけることが示された。

【0138】例2 血管：ヒトドナー伏在静脈

伏在静脈は死体ドナーから採取され、米国内の組織バンクから入手できる。組織バンクでは獲得ガイドラインを制定しており、これはアメリカン・アソシエーション・オブ・ティッシュ・バンクズ(American Association of Tissue Banks)により発行されている。これらのガイドラインは患者選択、同意書の完了及び切開プロセス時に静脈に対する機械的拡張又は他の機械的障害を避けるための注意に関する指示を含む。

【0139】採取はヘパリン5000単位及びババペリン120mgで補充された注射用プラズマライト(Plasmatite)溶液1000ccからなる静脈フラッシング溶液(1リットル/静脈)で、静脈のフラッシング及び拡張により始める。静脈を少くとも5mmの長さでできるだけ多くの支管を無傷に維持しながら無菌条件下で慎重に取出す。これらの支管を3-0絹糸で結紮する。周辺の脂肪組織も静脈周囲の広い縁で維持する。静脈を取出してから、それを静脈フラッシング溶液で再度洗い、ババペリン60mgで補充されたRPMI640組織培養地500ccからなる冷(4℃)静脈輸送培養地500cc中にパッケージ化し、更に加工処理のため組織バンクに一夜輸送する。

【0140】組織バンクにおいて、すべての支管を縫合結紮し、皮下脂肪/軟組織を標準外科処置で除去する。切開後、静脈からセロキシン(240μg/ml)、リンコマイシン(120μg/ml)、ポリミキシンB硫酸(100μg/ml)及びバンコマイシン(50μg/ml)で補充された組織培養地中にそれをおくことによりあらゆる表面汚染物質を除く。静脈を抗生物質混合液中4℃で24時間維持する。消毒された静脈をRPMI640組織培養地500ccからなる冷(4℃)輸送培養地500cc中にいれ、一夜輸送によりライブ・セルズ組織加工処理センターに湿潤氷上で輸送する。

【0141】到着時に容器温度が少くとも4℃であることを確認する。確認後、静脈を冷凍溶液含有容器中にいれ、室温で1時間インキュベートする。冷凍溶液は下記からなる：

0. 5Mジメチルスルホキシド(DMSO)
0. 5Mプロピレングリコール
0. 25M2, 3-ブタンジオール
2. 5%(w/v) ラフィノース
12. 0%(w/v) スクロース
0. 5%(w/v) ポリビニルピロリドン(PVP)
15. 0%デキストラン。

【0142】インキュベート後、静脈を水蒸気を出すか細菌の侵入を防げる多孔質ベントを有する不活性プラスチックバッグ中にいれ、ヒートシールする。次いでバッグ及び静脈を液体窒素への投入により凍結させる。凍結された静脈を-160℃以下の温度で貯蔵する。

【0143】乾燥のため、バッグ内の凍結静脈を液体窒素下で分子蒸留乾燥機に移し、米国特許第4, 865,

871号明細書で記載された方法により乾燥する。前記低温溶液で加工処理され急速に凍結された伏在静脈の場合、乾燥に関する至適範囲は乾燥相時に1℃/minの加熱速度で-130℃〜-70℃である。乾燥されると、静脈を乾燥不活性窒素ガス下で容器内に密封し、移植に必要とされるまで冷蔵温度(2〜4℃)で貯蔵する。

【0144】静脈はプラスチックポーチ容器を開けて静脈を37℃加温インキュベーターにに入れることにより蒸気相中で再水化させる。静脈をこのインキュベーター中で1時間維持し、しかる後それを取り出し、リン酸緩衝液(PBS)と共に容器にいれる。次いで静脈をPBSで3回交換しながら洗う。

【0145】加工処理された静脈の分析ではそれらが光学及び電子顕微鏡観察双方によると無傷の細胞外基質を有することを示す。プロテアーゼ切断ではコラーゲンの分解感受性の増加を示さない。人工心臓での動的ループに関する応力試験では液体又はガスのいずれかに対するそれらの漏出障壁機能の毀損なしに超生理学的圧力にそれらが耐えることを証明した。

#### 20 【0146】例3 動物研究用の血管加工処理 獲得

いずれかの性の20〜30kg種イヌをペンタトールナトリウムで誘導し、挿管し、無菌的に準備して布で覆う。麻酔を酸素、窒素及びフロタンで維持する。中線切開を首で行い、その際後頭頸動脈及び内頸動脈を露出させ、摘出し、周辺筋膜を除く。この操作中に、pH7.4の無菌ハanks緩衝液(HBS)1000cc中へババペリン5000単位及びババペリン120mgからなるフラッシング溶液を針及びシリンジで血管上にスプレーする。次いで血管の近位及び遠位末端を無外傷血管クランプではさみ、血管を急いで切出す。直ちに血管を前記フラッシング溶液で何度もフラッシングし、輸送のため4℃フラッシング溶液にいれる。一方、血管は輸送中にインキュベーターのため下記脱細胞化溶液Aにいれてもよい。

#### 【0147】脱細胞化

余分な筋膜のトリミング後、血管を脱細胞化溶液A(DSA)にいれる。DSAはpH7.5で無菌PBSベース中25mM EDTA、1M NaCl及び8mM CHAPS又は同様の双極性界面活性剤からなる。30分間〜1時間のインキュベート後、血管をPBSで2回にわたって10分間洗浄し、しかる後脱細胞化溶液B(DSB)にいれる。DSBはpH7.5で無菌PBSベース中25mM EDTA、1M NaCl及び1.8mMデシル硫酸ナトリウム(SDS)又は同様のアニオン系もしくはノニオン系界面活性剤からなる。30分間〜1時間のインキュベート後、血管をPBSで2回にわたって10分間洗浄する。

#### 【0148】ガラス質化

脱細胞化後、血管をガラス質化溶液フィティ・フィ

ディ(VSFF)に1~5時間入れる。VSFFは50/50(容量による)水・ホルムアミド溶液中2.5%ラフィノース、分子量40,000の15%ポリビニルピロリドン(PVP)、分子量70,000の15%デキストラン及び12%スクロースからなる。次いで血管を沸騰の停止でわかるように凍結するまで液体窒素(LN<sub>2</sub>)中に急いで沈める。その後で血管はLN<sub>2</sub>もしくはLN<sub>2</sub>蒸気中で貯蔵しても又は直ちに乾燥してもよい。

#### 【0149】乾燥

ガラス質化後、血管を-196℃に前冷却された特定の分子蒸留乾燥機サンプルホルダーに窒素ガス雰囲気下で移す。次いでサンプルホルダーを分子蒸留乾燥機に窒素ガス雰囲気下で急いで移す。次いで乾燥機を排気し、特にVSFFに関して開発されたプロトコルに従いランさせる。1×10<sup>-4</sup>mbar以下の真空下で、サンプルホルダーを下記プロトコルに従い加熱する：

10時間で-196℃→-150℃

80時間で-150℃→-70℃

10時間で-70℃→20℃

次いで乾燥機を開け、血管を窒素ガス雰囲気下で密封無菌ガラスバイアルに移す。次いで血管を必要になるまで4℃で貯蔵する。

#### 【0150】再水和

使用24時間前に、ガラスバイアルを湿度100%、37℃雰囲気下で開ける。血管をこうして1~2時間にわたって蒸気再水和に付す。次いで血管を4℃で無菌PBS中に2時間沈める。次いでPBSを新鮮溶液と交換し、そこで血管を4℃で一晩貯蔵する。血管は翌日になれば使用できる。

#### 【0151】例4 ブタ心臓小葉

ブタ心臓弁を屠殺場で屠殺直後に摘出された心臓から得た。無傷弁の小葉から板状体を無菌条件下でパンチバイオプシーにより得、4℃で5.6mMグルコース、0.33mMピルビン酸ナトリウムと共に0.025mM/α-トコフェノールリン酸塩、50mM/アスコルビン酸及び10mM/グルタチオン(ナトリウム)からなる酸化防止剤が添加されたダルベッコPBSを含む輸送溶液に移した。

【0152】組織の受領時、板状体を0.5M DMSO、0.5Mプロピレングリコール、0.25M2,3-ブタンジオール、2.5%ラフィノース、15%ポリビニルピロリドン、15%デキストラン及び12%スクロースからなる低温溶液に移し、速度に操作しながら20℃で60分間インキュベートした。

【0153】次いで組織サンプルをその組織サンプルのサイズに合う薄銅基板上におき、液体窒素浸漬により冷却した。

【0154】次いで凍結サンプルを更に加工処理するまで-160℃以下で貯蔵した。

【0155】乾燥前、サンプルを熱電対及びヒーター装備のサンプルホルダーに液体窒素下で移した。サンプルホルダーを液体窒素温度まで前冷却し、移動を液体窒素下で完了させた。

【0156】次いで凍結サンプルを分子蒸留乾燥機に装填し、米国特許第4,865,871号明細書に記載された方法を用いて分子蒸留乾燥機により乾燥した。用いられた乾燥サイクルは-180~-150℃で3時間、-150~-70℃で80時間及び-70~+20℃で9時間であった。乾燥後、乾燥室内の真空を超高純度窒素ガスで置換え、板状物を加工処理までの雰囲気下で維持した。

【0157】乾燥サンプルの再水和は最初に37℃で60分間にわたる湿度100%へのサンプルの蒸露であった。次いでサンプルを下記の1つからなる再水和溶液中で再水和させた：

a. 0.06Mベセス緩衝液

b. 0.06Mベセス緩衝液+0.06M MgCl<sub>2</sub>

c. 0.06Mベセス緩衝液+1%SDS

20 d. 0.06Mベセス緩衝液+0.5mM PMSP

サンプルを攪拌しながら少くとも4時間インキュベートした。

【0158】再水和後、サンプルを下記基準下で評価した：

a. 構造を光学及び電子顕微鏡観察の双方により評価したところ、弁基質は新鮮未処理加工サンプルの場合と区別しないことがわかった。

【0159】b. プロテアーゼ切断では新鮮サンプルと同等であることがわかった。

30 【0160】c. 応力試験(静的)ではコントロールサンプルよりも大きな応力負荷に耐えうるということがわかった。

【0161】d. 皮下動物内植片モデル、しかも後7又は21日目以外植片外植サンプルは以下を示した：

i. 新鮮又は低温保存コントロールと比較して炎症形成の減少

ii. グルタルアルデヒド処理コントロールと比較して石灰化の減少

iii. 下記のような再水和溶液の性質に依存する可変的な炎症細胞侵入：

処理：0.06Mベセス緩衝液中0.06M MgCl<sub>2</sub>

明確に測定される板状体であって、十分に規定される正常な弁形態。サンプルは薄い炎症で不完全に囲まれ、板状体周辺近くで炎症細胞侵入は最少である。

処理：0.06Mベセス緩衝液中1%SDS

明確に測定される板状体であって、十分に規定される正常な弁形態。サンプルはMgCl<sub>2</sub>処理サンプルで観察された場合よりもやや厚い炎症で完全に囲まれる。炎症

50 細胞侵入は最少である。

処理：0.06Mへブス緩衝液中0.5mM PMSF  
十分に規定される正常な弁形態。英膜形成はほとんど不  
存在。炎症細胞侵入は最少である。

処理：コントロール-0.06Mへブス緩衝液  
あまり規定されない弁形態。かなりの炎症細胞侵入、但  
し英膜形成の証拠はほとんどない。

【0162】例5 無傷のブタ心臓弁

獲得

ブタ心臓弁を屠殺場で屠殺直後に抽出された心臓から得  
る。次いで大動脈弁及び少くとも1インチ以上の上行大  
動脈を前滅菌器具で慎重に切出す。

【0163】弁を無菌リン酸緩衝液(PBS)で2回洗  
浄し、しかる後輸送用の無菌10℃PBSにのける。獲  
得から3時間以内に弁をライフェル施設に移し、そこで  
更にトリミング及び加工処理する。

【0164】脱細胞化

トリミング後、無傷の弁を脱細胞化溶液A(DSA)に  
入れる。DSAはpH7.5で無菌PBSベース中25  
mM EDTA、1M NaCl及び8mM CHAPS又  
は同様の双極性界面活性剤からなる。30分間〜1時間  
のインキュベーション後、弁をPBSで2回にわたり10分  
間洗浄し、しかる後脱細胞化溶液B(DSB)に入れ  
る。DSBはpH7.5で無菌PBSベース中25mM  
EDTA、1M NaCl及び1.8mMデシル硫酸ナ  
トリウム(SDS)又は同様のアニオン系もしくはノニ  
オン系界面活性剤からなる。30分間〜1時間のインキ  
ュベーション後、弁をPBSで2回にわたり10分間洗浄す  
る。

【0165】ガラス質化

脱細胞化後、弁をガラス質化溶液フィフティ・フィフティ  
(VSFF)に1〜5時間入れる。VSFFは50/  
50(容量による)水-ホルムアミド溶液中2.5%ラ  
フィノス、分子量40,000の15%ポリビニルピ

\*ロリドン(PVP)、分子量70,000の15%デキ  
ストラン及び12%スクロースからなる。次いで弁を沸  
騰の停止でわかるように凍結するまで液体窒素(L  
N<sub>2</sub>)中に急いで沈める。その後で弁は乾燥前にLN<sub>2</sub>  
又はLN<sub>2</sub>蒸気中で貯蔵してもよい。

【0166】乾燥

ガラス質化後、弁を-196℃に前冷却された特定の分  
子蒸留乾燥機サンプルホルダーに窒素ガス雰囲気下で移  
す。次いでサンプルホルダーを分子蒸留乾燥機に窒素ガ  
ス雰囲気下で急いで移す。次いで乾燥機を排気し、特に  
VSFFの再水和用に最適化された加熱サイクルを始め  
た。1×10<sup>-4</sup> mbar以下の真空下で、サンプルホルダー  
を下記プロトコルに従い加温する：

10時間-196℃→-150℃

80時間-150℃→-70℃

10時間-70℃→20℃

次いで乾燥機を開け、弁を窒素ガス雰囲気下で密封無菌  
ガラスバイアルに移す。次いで弁を移植に必要となるま  
で4℃で貯蔵する。

【0167】再水和

使用24時間前に、ガラスバイアルを湿度100%、3  
7℃雰囲気下で開ける。弁をこうして1〜2時間にわた  
り蒸気再水和に付す。次いで弁を4℃で無菌PBS中に  
2時間沈める。次いでPBSを新鮮溶液と交換し、そこ  
で弁を4℃で一晩貯蔵する。弁は翌日になれば使用でき  
る。

【0168】本発明は好ましい態様に関して記載されて  
きたが、バリエーション及び変更が発明の概念、精神及  
び範囲から逸脱せずにここで記載された方法のステップ  
において組成、方法、ステップ及びステップの順序に適  
用してよいことは当業者にとり明らかである。このよ  
うな置換え及び変更も請求の範囲で規定されるような発  
明の範囲内に属すると考えられる。

フロントページの続き

(72)発明者 アブヒジト、ナグ  
アメリカ合衆国テキサス州、ヒュースト  
ン、ブラム、レイク、ドライブ、8654

(72)発明者 ケン、ビー、ニコルス  
アメリカ合衆国テキサス州、ヒュースト  
ン、ラ、カバナ、16106

(72)発明者 エドワード、エス、グリフィー  
アメリカ合衆国テキサス州、バーランド、  
ベケット、2912

(72)発明者 クリストファー、コールマン  
アメリカ合衆国テキサス州、ヒュースト  
ン、バンクス、2117